

ALKYLDICHLORPHOSPHINE

Neue hochreaktive Derivatisierungsreagenzien
und ihre Anwendung in der klinischen Chemie

Günter Schnabl

Diss. München
1984



Aus dem Institut für Klinische Chemie am Klinikum
Großhadern der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Knedel

Alkyldichlorphosphine
Neue hochreaktive Derivatisierungsreagenzien
und ihre Anwendung in der klinischen Chemie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günter Schnabl

aus
Amberg

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Vogt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Kuß

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 2. 1984

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Vogt in der Zeit von Mai 1979 bis Dezember 1981 am Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern der Universität München (Direktor Prof. Dr. M. Knedel) durchgeführt.

Gedankt sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Forschungsvorhabens DFG VO 181/2

Einleitung und Problemstellung	2
<u>A. Bisheriger Kenntnisstand</u>	4
<u>A. I. Monofunktionelle nicht phosphorhaltige Derivatisierungsreagenzien</u>	4
I. 1. Trimethylsilylierung	4
I. 2. Alkylierung	6
I. 3. Arylierung	7
I. 4. Acylierung	7
I. 5. Benzoylierung	8
<u>A. II. Bifunktionelle nicht phosphorhaltige Derivatisierungsreagenzien</u>	9
II. 1. Acetalisierung und Ketalisierung	9
II. 2. Cyclosilylierung	10
II. 3. Boronierung	11
II. 4. Bildung cyclischer Carbonate und cyclischer Sulfite	12
II. 5. Azlactonbildung	13
<u>A. III. Monofunktionelle phosphorhaltige Derivatisierungsreagenzien</u>	13
III. 1. Phosphorsäureverbindungen	13
III. 1. 1. Phosphorsäurediäthylesterchlorid	14
III. 1. 2. Phosphoroxychlorid	14
III. 2. Thiophosphorsäureverbindungen	14
III. 2. 1. Thiophosphorsäuredimethylesterchlorid	15
III. 3. Phosphorigsäureverbindungen	15
III. 3. 1. 2-Chlor-1. 3. 2-Dioxaphospholane	15
III. 3. 2. 2-Chlor-1. 3. 2-Dioxaphosphorinan	16
III. 4. Phosphonsäureverbindungen	16
III. 5. Phosphinsäureverbindungen	17

III. 5. 1.	Dimethylphosphinsäurechlorid	17
III. 5. 2.	Dimethylphosphinsäuredimethylamid	18
III. 6.	Thiophosphinsäureverbindungen	18
III. 6. 1.	Dimethylthiophosphinsäurechlorid	18
III. 7.	Phosphinigsäureverbindungen	19
<u>A. IV.</u>	<u>Bifunktionelle phosphorhaltige Derivatisierungsreagenzien</u>	20
IV. 1.	Präparative Umsetzungen mit fünfbindigen Phosphorverbindungen	20
IV. 2.	Derivatisierungsreaktionen für gaschromatographische Bestimmungen mit Äthylthiophosphonsäuredichlorid	21
IV. 3.	Präparative Umsetzungen mit dreibindigen Phosphorverbindungen	22
<u>B.</u>	<u>Ergebnisse und Diskussion</u>	25
<u>B. I.</u>	<u>Wahl der Derivatisierungsreagenzien</u>	25
I. 1.	Wahl des Reaktionsweges	25
I. 2.	Die Bindigkeit der Phosphorverbindungen	27
I. 3.	Zahl der funktionellen Gruppen	28
I. 4.	Der organische Rest	29
<u>B. II.</u>	<u>Neue Derivatisierungsverfahren mit bifunktionellen phosphorhaltigen Reagenzien</u>	30
<u>II. 1.</u>	<u>Umsetzungen mit Phosphorhalogenverbindungen der Koordinationszahl 5</u>	30
II. 1. 1.	Umsetzung mit Methylthiophosphonsäuredichlorid in Gegenwart von Triäthylamin	30

II. 1. 2.	Umsetzungen mit Methylthiophosphonsäurechlorid und Dimethylthiophosphinsäurechlorid nach Metallierung mit n-Butyllithium	
<u>B. II. 2.</u>	<u>Umsetzungen mit Phosphorhalogenverbindungen der Koordinationszahl 3</u>	34
II. 2. 1.	Darstellung und gaschromatographische Eigenschaften von Phosphonigsäurediamiden	34
II. 2. 2.	Umsetzung mit Alkyldichlorphosphinen und Schwefel	35
II. 2. 2. 1.	Derivatisierung monofunktioneller Amine	37
II. 2. 2. 2.	Derivatisierung bifunktioneller Verbindungen	38
<u>B. II. 3.</u>	<u>Eigenschaften der Alkylthiophosphonsäurederivate</u>	41
II. 3. 1.	Chemische und thermische Eigenschaften	41
II. 3. 2.	Gaschromatographische Eigenschaften	42
II. 3. 3.	Elektronenstoßionisationsmassenspektren der Alkylthiophosphonsäurederivate	44
II. 3. 3. 1.	Monoaminderivate	44
II. 3. 3. 2.	Derivate der bifunktionellen Verbindungen	45
II. 3. 3. 3.	Derivate der Ephedringruppe und des Propranolols	46
<u>B. III.</u>	<u>Anwendung der Derivatisierungsmethode mit Methylchlorphosphin/S auf die quantitative Bestimmung von Ephedrin</u>	51

III. 1.	Chemische und pharmakologische Eigenschaften von Ephedrin	51
III. 2.	Bekannte quantitative Bestimmungsverfahren	53
III. 3.	Quantitative Bestimmung von Ephedrin nach Derivatisierung mit Methylchlorphosphin/Schwefel	57
III. 3. 1.	Detektion	57
III. 3. 2.	Interner Standard	58
III. 3. 3.	Quantitative Bestimmung von Ephedrin aus organischen Lösungsmitteln im Milli- und Mikrogrammbereich	58
III. 3. 4.	Quantitative Bestimmung von Ephedrin im Nanogrammbereich nach Extraktion aus wässrigen Medien	60
III. 3. 4. 1.	Extraktion	60
III. 3. 4. 2.	Bestimmung von Ephedrin aus Wasser	61
III. 3. 4. 3.	Bestimmung von Ephedrin aus Urin	63
III. 3. 4. 3.	Bestimmung von Ephedrin aus Serum	64
III. 3. 4. 5.	Klinische Anwendung der Derivatisierung mit Methylchlorphosphin/Schwefel zur Bestimmung des Ephedrin-spiegels	66
<u>B. IV.</u>	<u>Zur Toxizität der Thiophosphonsäure- derivate und des Methylchlorphos- phins</u>	68
<u>C.</u>	<u>Experimenteller Teil</u>	70
C. I.	Apparative Ausstattung	70
I. 1.	Gaschromatograph	70
I. 2.	Massenspektrometer	70
I. 3.	NMR-Gerät	70
C. III. 1.	GC-MS-Bedingungen für die quanti- tativen Bestimmungen im Milli- und Mikrogrammbereich	71

III. 2.	GC-MS-Bedingungen für die quantitative Bestimmung des Ephedrins im Nanogrammbereich	71
<u>Methoden</u>		72
C. IV.	Derivatisierungsreaktionen und qualitative GC-MS-Bestimmungen	72
IV. 1.	Umsetzungen mit Methylthiophosphonsäuredichlorid	72
IV. 2.	Umsetzungen nach Metallierung mit n-Butyllithium	74
IV. 3.	Umsetzungen mit Alkyldichlorphosphinen	76
C. V.	Quantitative Bestimmung von Ephedrin im Milli- und Mikrogrammbereich	86
C. VI.	Quantitative Bestimmung von Ephedrin im Nanogrammbereich nach Extraktion aus wässrigen Medien	88
VI. 1.	Bestimmung von Ephedrin aus Wasser	89
VI. 2.	Bestimmung von Ephedrin aus Urin	91
VI. 3.	Bestimmung von Ephedrin aus Serum	93
VI. 4.	Bestimmung des Ephedrinspiegels	95
<u>D.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	96
Literaturverzeichnis		102
Anhang		111

Einleitung und Problemstellung

Zur analytischen Trennung und der Identifizierung von Gemischen flüchtiger Komponenten bewies die Gaschromatographie eine bisher von kaum einen anderen Verfahren erreichte Selektivität und Empfindlichkeit. Aufgrund der außerordentlichen Vielseitigkeit konnte diese Analysenmethode nicht nur für chemische und biochemische Fragestellungen, sondern auch für klinisch-chemische, toxikologische, pharmakologische, forensische, genetische und ökologische Probleme erfolgreich eingesetzt werden.

Dabei kam es zu einer ständigen Verbesserung sowohl der chromatographischen Trennleistung als auch der Detektion, wozu einerseits die Einführung der Kapillarsäulentechnik, andererseits die Entwicklung hochspezifischer Detektoren, wie der Elektroneneinfangdetektor (ECD), der Alkaliflammenionisationsdetektor (AFID), der flammenphotometrische Detektor (FPD) und das Massenspektrometer beigetragen hat.

Um jedoch die Vorzüge der Gaschromatographie im vollen Umfang zu nutzen und eine Analyse in hochempfindlichen Bereichen zu ermöglichen, ist eine gute Abstimmung zwischen Säule und Detektor einerseits und Substanzeigenschaften andererseits notwendig. Durch geeignete chemische Reaktionen läßt sich dabei häufig eine primär nicht geeignete Verbindung in eine gut gaschromatographisch analysierbare Form umwandeln.

Ziel dieser Arbeit war es, ein geeignetes Derivatisierungsverfahren für Verbindungen zu entwickeln, deren chemische Struktur benachbarte funktionelle Hydroxyl- und/oder Aminogruppen aufweist. Stoffe dieses Strukturmerkmals werden sowohl in großer Zahl von biologischen Systemen sezerniert, als auch in Form von Arzneimitteln zugeführt; ihre analytische gaschromatographische Bestimmung ist daher von besonderem medizinischen Interesse. Zu erwähnen sind dabei in erster

Linie die Katecholamine und deren Metaboliten, sowie die synthetischen Sympathomimetika und Sympatholytika.

Unser Augenmerk richtete sich dabei auf die Synthese und Analyse von Organophosphorderivaten, zum einen wegen der hohen Bildungstendenz der P-O- und P-N - Bindung, zum anderen wegen der guten Chromatographierbarkeit der aus monofunktionellen Aminen und Alkoholen gebildeten Dimethylthiophosphinsäurederivate⁶⁰⁾, die ein ähnliches Verhalten für Organophosphorderivate bifunktioneller Alkohole oder Amine erwarten läßt.

Mit der Einführung eines phosphororganischen Substituenten wurde beabsichtigt:

- eine irreversible Adsorption aufgrund der freien OH- und NH-Gruppen der Ausgangsverbindung im Injektor, Säule oder Detektor zu vermeiden,
- die Selektivität und Empfindlichkeit des gaschromatographischen Verfahrens durch den Nachweis am phosphorspezifischen Alkaliflammenionisationsdetektor zu steigern,
- Derivate mit einem günstigen Fragmentierungsverhalten, dh. intensiven Molekülionen oder substanzspezifischen Fragmentionen für den Nachweis mit dem Massenspektrometer darzustellen.
- die Flüchtigkeit der zu bestimmenden Ausgangsverbindungen durch Lösung bestehender Wasserstoffbrückenbindungen zu erhöhen,
- das chromatographische Trennvermögen durch Modifizierung der Retentionszeiten zu verbessern, z. B. zur Auftrennung epimerer und enantiomerer Verbindungen.

Die Derivatisierung bifunktioneller Verbindungen mit phosphorhaltigen Substituenten ist für größere Ansätze in der

Literatur beschrieben¹¹³⁾, sie scheiterte jedoch in physiologischen Konzentrationsbereichen an der mangelnden Reaktionsfähigkeit der Reagenzien.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene Phosphorverbindungen auf ihre Reaktivität gegenüber geeigneten Modellsubstanzen überprüft. Danach sollte anhand der Bestimmung des Plasma- und Urinspiegels eines gängigen Medikamentes die mögliche klinische Anwendbarkeit unter Beweis gestellt werden.

A. Bisheriger Kenntnisstand

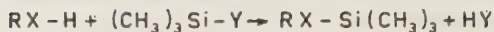
Derivatisierungsverfahren für die Gaschromatographie von Hydroxy- und Aminoverbindungen

A. I. Monofunktionelle nicht phosphorhaltige Derivatisierungsreagenzien

Aus der Vielzahl der bekannten Verfahren sollen nur die gebräuchlichsten herausgegriffen werden. Darüber hinaus sei auf das Handbuch von Blau und King⁷⁾ sowie auf die Übersichtsarbeiten von Drozd³³⁾, Nicholson^{95,96)} und Brooks¹¹⁾ verwiesen.

A. I. 1. Trimethylsilylierung

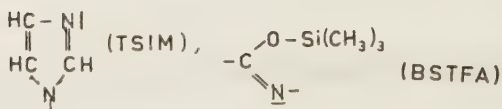
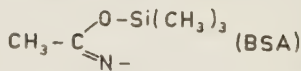
Die Trimethylsilylierung ist eine der vielseitigsten Derivatisierungsreaktionen für die gaschromatographische Bestimmung von Verbindungen mit freien Hydroxyl- und Aminogruppen. Zahlreiche Reagenzien sind für die Durchführung der Reaktion beschrieben^{106,108)}.



R = Alkyl, Aryl

X = O, NH, NR

Y = Hal.,



Trimethylsilylderivate von primären und sekundären Alkoholen sowie Phenolen lassen sich aufgrund der hohen Bildungstendenz der Si-O-Bindung mit nahezu allen Silylierungsreagenzien in einfacher Weise erhalten. Schwieriger verläuft nur die Silylierung von Verbindungen mit sterisch gehinderter OH - Gruppe, die aber durch Verwendung von Reagenzien mit hohem Silylierungspotential wie Trimethylsilylimidazol (TSIM)¹⁸⁾ oder Katalyse mit Spuren von Wasser¹⁰⁹⁾ durchgeführt werden kann.

Eine wesentlich niedrigere Bildungstendenz als die Si-O-Bindung besitzt die Si-N-Bindung. Deshalb ist die Reaktivität der primären und sekundären Amine im Vergleich zu Alkoholen und Phenolen beträchtlich erniedrigt⁸⁸⁾. Zur Darstellung der Trimethylsilyl-Amino-Derivate sind daher hochreaktive Silylierungsmittel wie N,O-bis-Trimethylsilylacetamid (BSA) oder N,O-bis-Trimethylsilyltrifluoracetamid (BSTFA) erforderlich¹⁰⁸⁾.

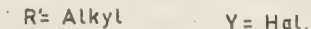
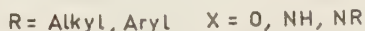
Die Trimethylsilyl-Derivate von Alkoholen und Aminen zeichnen sich durch eine hohe Flüchtigkeit aus. Durch die Einführung

der Trimethylsilylgruppe entstehen ausreichend hydrolyse-stabile, relativ unpolare Verbindungen, die an Siliconphasen mit niedriger Polarität ausgezeichnet getrennt werden können¹⁰⁶⁾.

Durch das Fehlen elementspezifischer Siliciumdetektoren und durch das Entstehen von störendem Siliciumdioxid in der Detektorflamme sind Trimethylsilylderivate jedoch zur Analyse im Subnanogrammbereich nicht geeignet.

A. I. 2. Alkylierung

Zur Alkylierung von Hydroxy- und Amino-Verbindungen dienen in erster Linie Alkylhalogenide.



Ein elegantes Verfahren für die Methylierung von Phenolen und Enolen ist die Umsetzung mit Diazomethan⁸⁰⁾, für die analoge Reaktion mit Alkoholen ist die Gegenwart von Lewis-säurekatalysatoren⁸⁹⁾ notwendig.



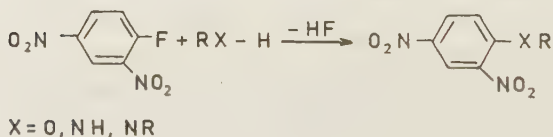
Durch Reaktionsgaschromatographie mit Trimethylaniliniumhydroxid lassen sich phenolische Hydroxyl-⁴²⁾ und saure Aminogruppen^{10,87)} in die betreffenden Methyläther überführen.



Die Alkylderivate von Alkoholen und Aminen sind thermisch und hydrolytisch außerordentlich stabil. Ihre geringe Polarität trägt entscheidend zu den guten gaschromatographischen Eigenschaften bei. Mit Ausnahme der Pentafluorbenzyl-Derivate⁷³⁾ können sie aber für die Ultraspurenanalytik mit elementspezifischen Detektoren nicht eingesetzt werden.

A. I. 3. Arylierung

Von praktischer Bedeutung in der Gaschromatographie sind die 2.4-Dinitrophenyl-Derivate, die durch Umsetzung mit 2.4-Dinitrofluorbenzol in Gegenwart einer Base erhalten werden^{19,29,35,84,114,136,142)}.

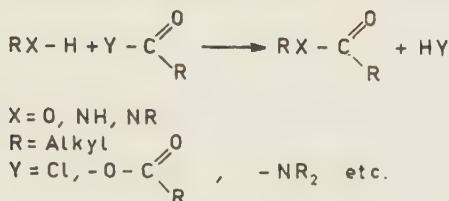


Diese Reaktion wurde 1945 von Sanger zur Sequenzanalyse von Polypeptiden entwickelt und führt zu hydrolysestabilen Verbindungen, die in ihrer Flüchtigkeit stark herabgesetzt sind¹⁹⁾. Sie können empfindlich und spezifisch mit dem Elektroneneinfangdetektor (ECD) noch im unteren Picogrammbereich erfaßt werden^{35,84)}.

A. I. 4. Acylierung

Zur Derivatisierung von Alkoholen und Aminen durch Übertragung eines Acylrestes dienen üblicherweise Säureanhydride, Säurehalogenide oder reaktive Acylverbindungen wie Acylimid-

azole oder Acylamide^{8,31,36}).



Durch Verwendung spezieller Acylierungskatalysatoren, z. B. 4-Dimethylaminopyridin, lassen sich auch sterisch gehinderte Verbindungen derivatisieren⁵⁵). Dieses Verfahren wird u. a. auf die Bestimmung von Phenolen aus Urin angewendet³⁸). Die entstehenden Verbindungen zeigen durchweg ausgezeichnete gaschromatographische Eigenschaften, besonders die sehr flüchtigen Perfluoracylabkömmlinge, die durch Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid³²), Pentafluorpropionsäureanhydrid¹) oder Heptafluorbuttersäureanhydrid¹³⁷) gut zugänglich sind und sich zum Teil noch im unteren Picogrammbereich detektieren lassen.

A. I. 5. Benzoylierung

Sie erfolgt analog der Acylierung und wird wegen der im Vergleich dazu verlängerten Retentionszeiten der entstehenden Verbindungen häufig für die Bestimmung niedermolekularer Alkohole und Amine eingesetzt⁴³); als Beispiel sei die Bestimmung von Äthylenglykol aus dem Serum über das Dibenzoylderivat angeführt¹⁰⁴).

Sehr empfindlich gelingt die Detektion der sehr leicht zugänglichen und stabilen Pentafluorbenzoyl-Derivate von Phe-

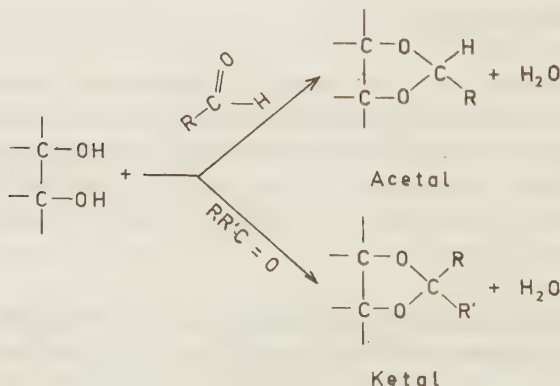
nolen⁸⁶⁾ und Aminen^{92,147)} mit dem Elektroneneinfangdetektor.

A. II. Bifunktionelle nicht phosphorhaltige Derivatisierungsreagenzien

Die Zahl bifunktioneller Reagenzien, die zur selektiven einstufigen Derivatisierung von Verbindungen mit zwei reaktiven Gruppen verwendet werden können, ist sehr klein. Die in folgender Übersicht zusammengestellten Reaktionen sind mit wenigen Ausnahmen von primär synthetischem und/oder strukturanalytischem Interesse und können meist nicht zur quantitativen Bestimmung im Nano- bzw. Picogrammbereich herangezogen werden.

A. II. 1. Acetalisierung und Ketalisierung²⁶⁾

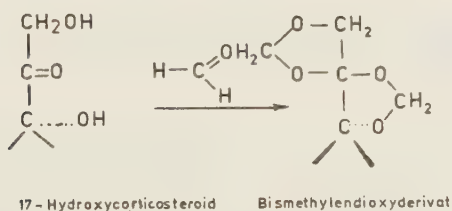
Cyclische Acetale oder Ketale werden aus Diolen, Triolen und Polyhydroxyverbindungen durch Umsetzung mit Aldehyden oder Ketonen gewöhnlich unter Bildung eines 1,3-Dioxolanringes gebildet. Besonders günstige massenspektroskopische Eigenschaften zeigen dabei wegen der besonders hohen Intensität des Fragmentes M-15 die Isopropyliden-Derivate, die durch Umsetzung mit Aceton entstehen.



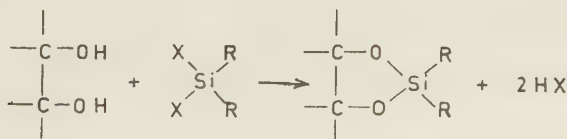
Dieses Verfahren hat seit 1895 ein breites Anwendungsgebiet in der Kohlehydratchemie, zum einen als Schutz reaktiver OH-Gruppen bei der Synthese, zum anderen bei der Struktur-aufklärung^{40,138)}.

Auf dem Gebiet der Gaschromatographie ist die Derivatisierung von Steroiden beschrieben; so konnten 3,16 α -Oestradiol⁵⁹⁾ und cispimere Oestriole¹²⁸⁾ erfolgreich getrennt werden.

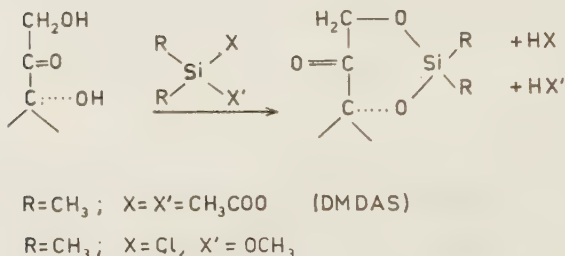
Weiterhin kann die unter normalen GC-Bedingungen eintretende Pyrolyse von 17- Hydroxycorticosteroiden zu 19- Ketosteroiden durch Cyclisierung mit Aldehyden oder Ketonen verhindert werden (desgleichen auch durch Boronierung und Silylierung, siehe A. II. 2. und A. II.3). Mit Formaldehyd entsteht dabei unter Säurekatalyse das Bismethylenedioxyderivat.



A. II. 2. Cyclo-Silylierung²⁷⁾



Die Bildung der den Acetalen bzw. Ketalen analogen cyclischen Silylderivate ist hauptsächlich für die gaschromatographische Analyse von Steroiden beschrieben. Während mit Dimethyldichlorsilan nur die Cyclisierung benachbarter OH-Gruppen zum 5-Ring gelingt^{39,74)}, können mit Dimethylmethoxy-chlorsilan und Dimethyldiacetoxysilan (DMDAS) auch Steroide mit Dihydroxyacetonsseitenkette, wie Cortison, Cortisol und Betametason in Gegenwart von Triäthylamin zum 6-Ring geschlossen werden^{75,76)}.

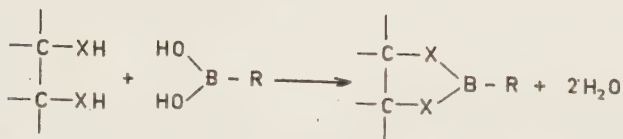


Die Bildung von Silizium-Stickstoff-Ringverbindungen, wie z. B. bei der Derivatisierung der Anthranilsäure¹⁴⁶⁾, sind von ausschließlich synthetischem Interesse.

A. II. 3. Boronierung²⁸⁾

Cyclische Borsäurederivate von Verbindungen mit benachbarten Hydroxy- und/oder Aminogruppen sind in großer Zahl beschrieben^{28,110,111,112,125)}. Besonders hingewiesen sei auf die Bestimmung von Zuckern¹²⁶⁾, Steroiden¹²⁾, Sphingosinen^{44,45)},

Ceramiden⁵⁹⁾ und Prostaglandinen^{77,78,98,99)} durch Umsetzung mit Borsäure oder substituierten Borsäuren^{77,78,98,99)}.



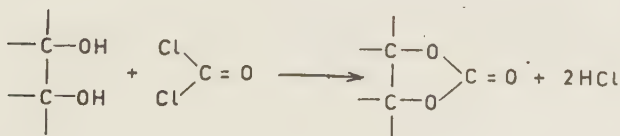
R = Alkyl, Aryl

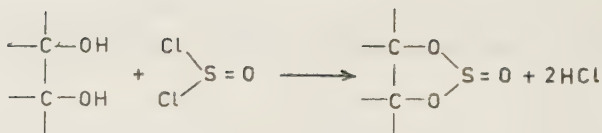
X = O, NR'

Die cyclischen Borsäureester und Boramide sind meist kurzzeitig gegen Luft beständig, werden aber durch Wasser oder schwache Säuren rasch zersetzt. Ihre gaschromatographischen Eigenschaften sind gut; sie können mit dem Alkaliflammen-detektor empfindlich nachgewiesen werden⁵⁰⁾.

A. II. 4. Bildung cyclischer Carbonate und cyclischer Sulfite

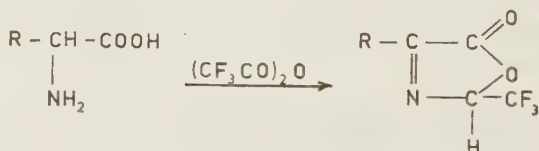
Die Ringschlußreaktionen von Diolen mit Phosgen zu cyclischen Carbonylverbindungen^{13,58,94,101)} und mit Thionylchlorid zu cyclischen Sulfiten¹³⁾ ist von ausschließlich präparativem Interesse und wurden bisher auch nur in den entsprechend großen Ansätzen durchgeführt, nicht jedoch im analytischen Maßstab.





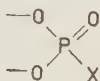
A. II. 5. Azlactonbildung

Diese Substanzgruppe wird durch Umsetzung von Aminosäuren mit Trifluoressigsäureanhydrid erhalten^{143,144}). Die Derivate zeichnen sich durch hohe Flüchtigkeit aus und können gut an gepackten Säulen⁴⁸) und an Kapillarsäulen¹⁴⁵) chromatographiert werden. Eine quantitative Bestimmung von Phenylalanin aus dem Serum ist beschrieben⁴⁹).

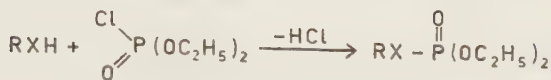


A. III. Monofunktionelle phosphorhaltige Derivatisierungsreagenzien

A. III. 1. Phosphorsäureverbindungen



A. III. 1. 1. Phosphorsäurediäthylesterchlorid



X = O, NH

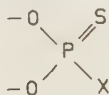
Diese Reaktion wurde sowohl zur Phosphorylierung von Alkoholen und Phenolen^{30,54,79}), als auch von Aminosäuremethylestern³⁶) eingesetzt. Die Umsetzungen wurden zum Teil im Submikrogrammbereich durchgeführt. Die Nachweisgrenzen liegen bei den Alkoholderivaten mit dem flammenphotometrischen Detektor, bei den Aminosäureesterderivaten mit dem Alkaliflammenionisationsdetektor im Picogrammbereich. Anwendungen auf biologische Untersuchungsmaterialien sind unseres Wissens nicht bekannt.

A. III. 1. 2. Phosphoroxychlorid

Flüchtige, gaschromatographierbare Derivate von Aminobenzolsulfonsäuren entstehen bei der Umsetzung mit überschüssigem Phosphoroxychlorid und Phosphorpentachlorid¹⁰⁰). Anwendungen dieses Derivatisierungsverfahrens auf quantitative analytische Probleme sind nicht beschrieben.



A. III. 2. Thiophosphorsäureverbindungen



A. III. 2. 1 Thiophosphorsäuredimethylesterchlorid⁹⁾

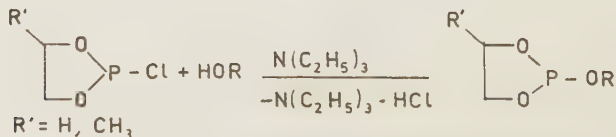


Mit diesem Reagenz ließen sich phenolische Spaltprodukte von Carbamat-Insektiziden aus Milch und Getreide quantitativ bestimmen. Die Nachweisgrenze ist jedoch durch störende Reaktionsnebenprodukte auf 400 pg beschränkt. Zudem ergaben Umsetzungen von Phenolen im Mikrogrammbereich sehr schlechte Ausbeuten²⁰⁾, das eine Anwendung für die Ultraspurenanalyse ausschließt.

A. III. 3. Phosphorigsäureverbindungen



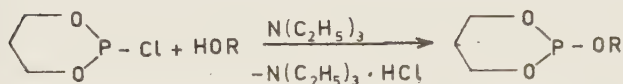
A. III. 3. 1. 2-Chlor-1.3.2.-dioxaphospholane¹²⁹⁾



Mit diesem Reagenz gelingen in Gegenwart von Triäthylamin als Protonenacceptor quantitative Bestimmungen von niederen aliphatischen Alkoholen.

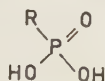
Die Derivate lassen sich an unpolaren Phasen gaschromatographisch trennen und können mit dem Alkaliflammenionisationsdetektor noch im Picogrammereich erfaßt werden.

A. III. 3. 2. 2-Chlor-1,3,2-Dioxaphosphorinan¹²⁹⁾

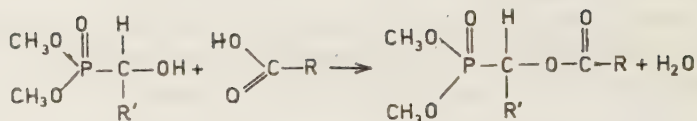


Diese Verbindung weist ähnliche Eigenschaften wie die Chlor-dioxaphospholane auf und kann ganz analog mit niedermolekularen Alkoholen umgesetzt werden. Eine praktische Anwendung ist bisher nicht beschrieben.

A. III. 4. Phosphonsäureverbindungen

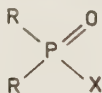


Geradkettige Fettsäuren lassen sich mit α -Hydroxyphosphonsäureestern zu α -Acyloxyphosphonsäureestern kondensieren¹²⁴⁾. Die Reaktion unterscheidet sich von den übrigen hier aufgezählten Derivatisierungen darin, daß die Verknüpfung an der Seitenkette erfolgt.



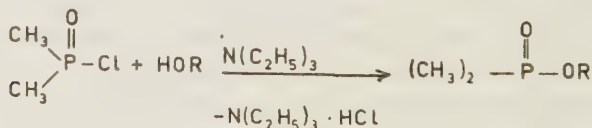
Für eine quantitative Esterbildung sind als Katalysatoren Dicyclohexylcarbodiimid und Pyridin erforderlich. Zum empfindlichen Nachweis im Picogrammbereich ist zur Abtrennung von überschüssigem Derivatisierungsreagenz eine Zweisäulen-anordnung notwendig. Eine praktische analytische Anwendung des Verfahrens ist nicht bekannt.

A. III. 5. Phosphinsäureverbindungen



A. III. 5. 1. Dimethylphosphinsäurechlorid

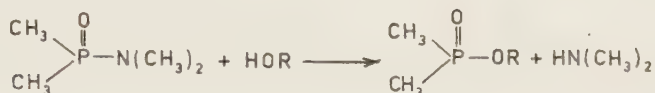
Verbindungen mit phenolischer Hydroxylgruppe wie z. B. Östron werden von diesem Reagenz in Gegenwart von Triäthylamin in glatter Reaktion phosphinyliert^{61,62}).



Bei Steroiden mit alicyclischen Hydroxylgruppen führt jedoch die überaus große Reaktivität des Dimethylphosphinsäurechlorides zu unerwünschten phosphorfreen Dehydratisierungsprodukten, wodurch der Einsatz begrenzt wird.

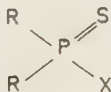
A. III. 5. 2. Dimethylphosphinsäuredimethylamid

Dieses Reagenz eignet sich ausgezeichnet für die präparative Umsetzung von Hydroxysteroiden zu den entsprechenden Phosphinsäureestern^{61,62}).



Im Gegensatz zu Dimethylphosphinsäurechlorid werden auch bei Steroiden mit alicyclischer Hydroxylgruppe keine Nebenreaktionen beobachtet. Die Anwendung des Verfahrens auf hochempfindliche Detektoren scheitert jedoch an der unzulänglichen Abtrennbarkeit des überschüssigen Reagenzes.

A. III. 6. Thiophosphinsäureverbindungen

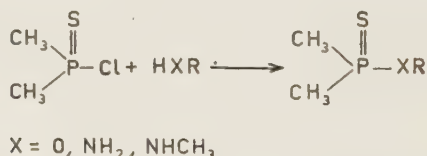


A. III. 6. 1. Dimethylthiophosphinsäurechlorid

Dimethylthiophosphinsäurechlorid ist zweifelsohne unter den monofunktionellen Phosphorreagenzien am besten zur Deri-

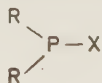
vatisierung von Hydroxy- und Aminoverbindungen geeignet. Es zeichnet sich durch eine hohe Reaktivität, einheitliche Reaktionsprodukte, mehrjährige Lagerbeständigkeit und kommerzielle Verfügbarkeit aus.

Eine große Anzahl von Hydroxysteroiden^{62,63,130,131}) und Aminen^{62,64,65,66,67,132}) konnte in Gegenwart von Triäthylamin im Nanogrammbereich umgesetzt und bis zu einer Nachweisgrenze im Pico- und Femtogrammbereich mit dem Alkaliflammenionisationsdetektor oder Massenspektrometer quantitativ bestimmt werden.



Die Anwendung dieses Verfahrens auf die Bestimmung von 3α -Etiocolanolon aus menschlichem Plasma hat sich bereits für klinische Fragestellungen bewährt^{68,133}).

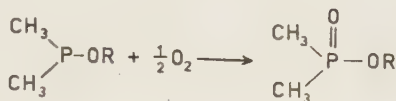
A. III. 7. Phosphinigsäureverbindungen



Die Umsetzung mit Steroiden ergibt nur im Milligrammbereich die zu erwartenden Dimethylphosphinigsäureester⁶⁹).



Im Mikro- und Nanogrammbereich führt die Beteiligung von Sauerstoffspuren zur Oxidation zu Dimethylphosphinsäurederivaten^{130,134,135}).



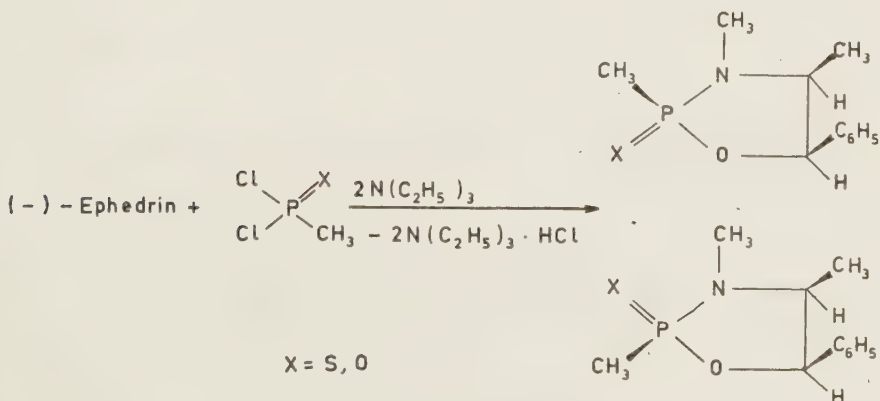
Die gaschromatographischen Eigenschaften dieser Derivate sind ausgezeichnet: ihre Nachweisgrenze mit dem Rubidiumsulfatdetektor beträgt 10 pg¹³⁰).

Die geringe Lagerstabilität und die schwierige Handhabbarkeit des Dimethylaminodimethylphosphins schränkt jedoch seine praktische Anwendbarkeit in hohem Maße ein.

A. IV. Bifunktionelle phosphorhaltige Derivatisierungsreagenzien

A. IV. 1. Präparative Umsetzungen mit fünfbindigen Phosphorverbindungen

Aus deren großen Zahl seien nur die Umsetzungen von Ephedrin und Pseudoephedrin mit Methylphosphonsäuredichlorid und Methylthiophosphonsäuredichlorid genannt^{21,22,23,52}).

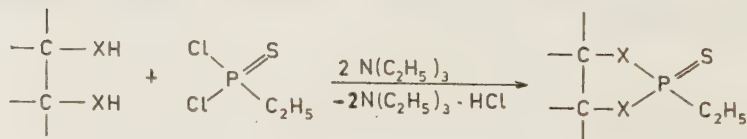


In Benzol als Lösungsmittel , sowie in Anwesenheit von Tri-äthylamin als Hilfsbase werden ausnahmslos Isomerenpaare erhalten, die auf einer Silicagel-Säule getrennt werden können.

Die entstehenden Verbindungen sind unter Normalbedingungen stabil; sie werden jedoch in Gegenwart von Säure oder Base als Katalysator durch Alkohole an der PN-Bindung gespalten.

A. IV. 2. Derivatisierungsreaktionen für gaschromatographische Bestimmungen mit Äthylthiophosphonsäuredichlorid¹¹³⁾

C. F. Poole et al.¹¹³⁾ versuchten den obigen Reaktionsablauf (IV. 1.) für die gaschromatographische Analyse zu nutzen. Sie beschreiben die Derivatisierung einer großen Anzahl von bifunktionellen Verbindungen mit benachbarten Hydroxyl- und/oder Aminogruppen in Gegenwart von Äthylthiophosphonsäuredichlorid.



X = O, NH, NR

Ein Teil der Umsetzungen führt analog der präparativen Reaktion mit Ephedrin (IV. 1.) zu stereoisomeren Ringverbindungen.



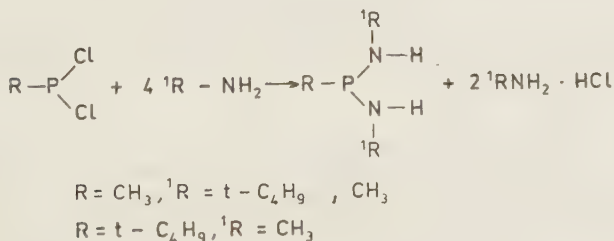
Die entstehenden cyclischen Thiophosphonsäureester und -amide sind thermisch und gegen Hydrolyse stabil. Sie zeigen charakteristische Massenspektren und können gaschromatographisch mit dem flammenphotometrischen Detektor bis in den unteren Picogrammbereich nachgewiesen werden. Die Umsetzung selbst wird jedoch mit einem relativ großen Ansatz durchgeführt, benötigt einen großen Überschuß Derivatisierungsreagenz und längeres Erhitzen zur quantitativen Umsetzung. Umsetzungen im Nano- und Subnanogrammbereich mit sterisch etwas anspruchsvolleren, weniger reaktiven Verbindungen wie sie zu Plasmaspiegelbestimmungen von Medikamenten notwendig wären, scheitern nach unseren Erfahrungen mit Methylthiophosphinsäurechlorid (B. II. 1.) an der zu geringen Reaktivität des Reagenzes.

A. IV. 3. Präparative Umsetzungen mit dreibindigen Phosphorverbindungen

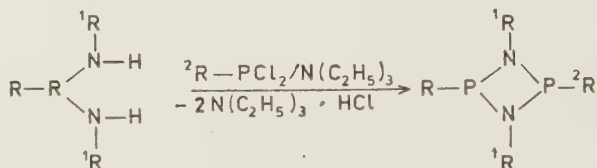
Umsetzungen mit Alkyldichlorphosphinen

Aus der präparativen phosphororganischen Chemie ist die im Vergleich zum fünfbindigen Phosphor höhere Reaktivität von dreibindigen Phosphorhalogenverbindungen bekannt.

So reagieren Amine mit Alkyldichlorphosphinen schon bei tiefen Temperaturen zu Phosphonigsäurediamiden^{115,116,117}).



Alkyldichlorphosphine als ringschließende Verbindungen wurden bei der Synthese von Diazadiphosphetiden in Gegenwart von Triäthylamin als Hilfsbase verwendet^{116,118}).



$\text{R} = \text{CH}_3, {}^1\text{R} = t\text{-C}_4\text{H}_9, {}^2\text{R} = \text{CH}_3$

$\text{R} = \text{CH}_3, {}^1\text{R} = t\text{-C}_4\text{H}_9, {}^2\text{R} = \text{Cl}$

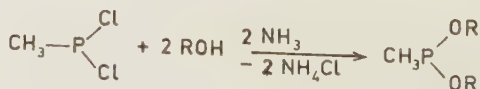
$\text{R} = t\text{-C}_4\text{H}_9, {}^1\text{R} = \text{CH}_3, {}^2\text{R} = t\text{-C}_4\text{H}_9$

Die entstandenen cyclischen Phosphonigsäurediamide lassen sich sehr leicht mit Elementen der VI. Hauptgruppe ($\text{O} \rightarrow \text{Te}$) zu den entsprechenden Phosphonsäurederivaten aufoxidieren^{115, 116,119}).

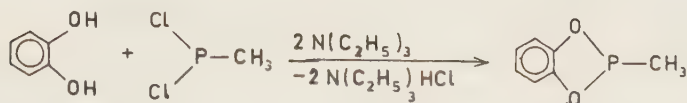


$\text{R}, {}^1\text{R}, {}^2\text{R} = \text{Alkyl}$

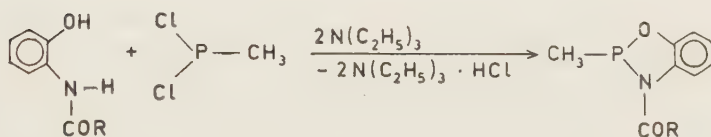
Alkohole reagieren in Gegenwart von Hilfsbase mit Methylchlorphosphin bei -40°C ⁹¹).



Cyclische Phosphonigsäurediester, wie beispielsweise aus Methylchlorphosphin und Brenzkatechin sind schon längere Zeit bekannt⁸²⁾.



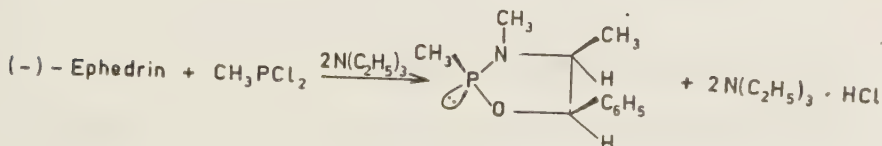
Ringschlußreaktionen mit Verbindungen, die sowohl eine Hydroxyl- als auch eine Aminogruppe aufweisen, sind beschrieben. Die Synthese von Benzoxaphospholenen nach



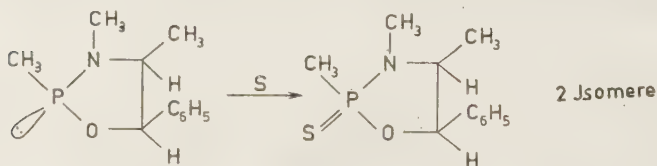
R = H, CH₃

erfolgt in beinahe quantitativer Ausbeute^{37,140)}.

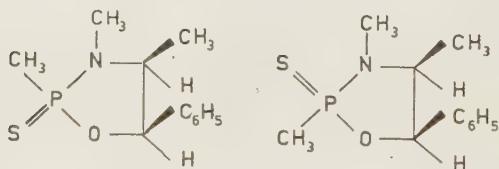
Bei ihren stereochemischen und präparativen Untersuchungen am Ephedrin (vgl. A. IV. 1.) setzten Cooper et al. nicht nur mit Methylthiophosphonsäuredichlorid sondern auch mit Methylchlorphosphin um²³⁾.



Die entstandene P(III)-Verbindung wurde anschließend mit Schwefel in das entsprechende P(V)-Derivat oxidiert.



Das Reaktionsprodukt ist identisch mit dem aus der Umsetzung mit Methylthiophosphonsäuredichlorid (vgl. IV. 1.). Die beiden stereoisomeren Ringverbindungen entstehen in etwas geringerer Ausbeute.



B. Ergebnisse und Diskussion

B. I. Wahl der Derivatisierungsreagenzien

In sehr niedrigen Konzentrationsbereichen müssen insbesondere an die Reaktivität des Reagenzes hohe Anforderungen gestellt werden, um quantitative und reproduzierbare Umsetzungen in einer angemessenen Zeit zu ermöglichen.

B. I. 1. Wahl des Reaktionsweges

Als Grundlage bietet sich dabei die aus der präparativen

organischen Chemie bekannte Reaktion von Alkoholen und Aminen mit Phosphorhalogenverbindungen nach



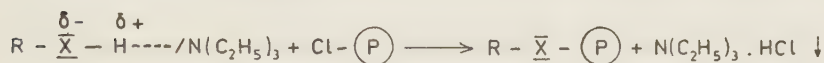
X = O, NHR

P = P(V) o. P(III)

an. Um das Gleichgewicht auf die Seite des Endproduktes zu verschieben, wird die Reaktion in Gegenwart von Basen durchgeführt.

Mit tertiären Aminen, wie z. B. Triäthylamin, entstehen dabei in organischen Lösungsmitteln schwer lösliche Hydrochloride, deren Löslichkeitsprodukt mit der Lösungsmittelpolarität abnimmt.

Durch die Ausbildung einer N...H-Wasserstoffbrückenbindung wird außerdem die nucleophile Reaktionsfähigkeit des Alkohols bzw. Amins zusätzlich erhöht.



X = O, NR

$\textcircled{P}$ = P(V) o. P(III)

Eine weitere Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei der Umsetzung von Aminen mit Phosphorhalogeniden kann durch die intermittierende Darstellung eines Lithiumamids mit Lithiumalkylen und folgende Lithiumchlorid-Abspaltung erreicht werden.



$X = NR$

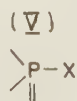
$R' = CH_3, n - C_4H_9$

$\overset{\circ}{P} = P(III) \text{ o. } P(V)$

Die Anwendung auf analytische Problemstellungen scheitert an der schlechten Lagerfähigkeit und ungenauen Dosierbarkeit der sehr hydrolyseempfindlichen lithiumorganischen Verbindung (s. B. II. 1. 2.).

B. I. 2. Die Bindigkeit der Phosphorverbindungen

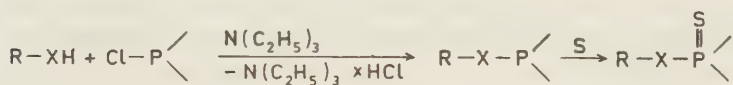
Die Reaktionsgeschwindigkeit der Derivatisierung mit Phosphorverbindungen kann durch die geeignete Wahl der Substituenten am Zentralatom gesteuert werden. Grundsätzlich stehen dabei zwei große Verbindungsklassen zur Auswahl, die durch die unterschiedliche Anzahl der Bindungsarme am Phosphor gekennzeichnet sind.



P(III)-Halogenide weisen eine höhere Reaktivität auf. Als nachteilig erweist sich jedoch die Instabilität des entstehenden P(III)-Derivates: nucleophile Agenzien - wie z. B. Wasser - führen zur Spaltung der PN-Bindung, Oxidantien - wie z. B. Luftsauerstoff - zur Oxidation.

P(V)-Verbindungen sind aufgrund der erhöhten sterischen Abschirmung des Zentralatoms sowie des Fehlens freier Elektronenpaare reaktionsträger, diese Faktoren erhöhen jedoch die Stabilität der Verbindungen. P(V)-Derivate mit Alkoholen und Aminen zeigen deshalb bekannterweise ausgezeichnete Eigenschaften im Gaschromatographen (s. A. III. 6.).

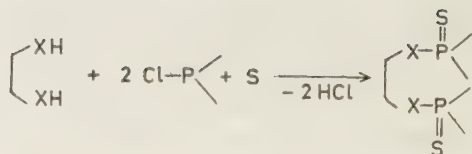
Um einerseits die hohe Reaktivität dreibindiger Phosphorhalogenide, andererseits die Stabilität und gute Chromatographierbarkeit von fünfbindigen Phosphorverbindungen für Analysen auszunutzen, kann in einer Zweistufenreaktion das bei der Umsetzung mit P(III)-Halogeniden primär gebildete Reaktionsprodukt mit einem geeigneten Oxidationsmittel in die entsprechende P(V)-Verbindung umgewandelt werden. Dazu bietet sich wegen seiner guten Handhabbarkeit und Dosierbarkeit elementarer Schwefel an.



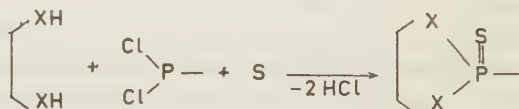
B. I. 3. Zahl der funktionellen Gruppen

Zur Derivatisierung von Verbindungen mit benachbarten OH- und/oder NH-Gruppen mit P(III)-Halogeniden und Schwefel sind zwei stöchiometrische Ansätze möglich:

Die 1:2 - Umsetzung mit monofunktionellen Phosphorhalogeniden nach



sollte zu relativ hochsiedenden Derivaten führen. Diese sind bei höhermolekularen Verbindungen schlecht für die Gaschromatographie geeignet; außerdem ist eine gegenseitige sterische Behinderung der beiden Phosphorreste mit Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit zu erwarten. Die 1:1-Umsetzung mit bifunktionellen Phosphordihalogeniden und Schwefel nach



führt zu niedrig siedenden und gut chromatographierbaren Ringverbindungen. Ringstruktur und stöchiometrische Zusammensetzung sollten sich außerdem auf die chromatographische Trennbarkeit von monofunktionellen Aminen oder Alkoholen günstig auswirken.

B. I. 4. Der organische Rest

Durch Variation des Substituenten R im Organophosphordihalogenid



R = CH₃, t-C₄H₉

kann die Reaktivität gesteuert werden. Bei Methylgruppen ist eine schnellere Umsetzung als bei den sterisch anspruchsvollen t-Butylgruppen zu erwarten. Andere Reste wie Methoxy- oder Amidogruppen kommen wegen einer möglichen Umesterung bzw. Umamidierung nicht in Frage.

B. II. Neue Derivatisierungsverfahren mit bifunktionellen phosphorhaltigen Reagenzien

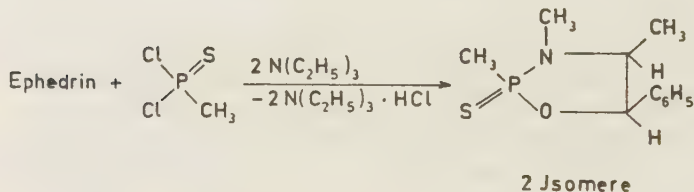
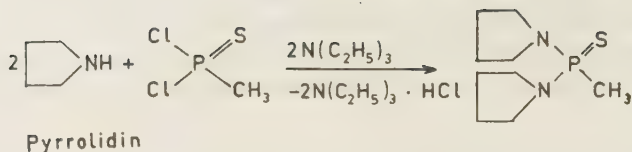
In B.II.1. wurde versucht durch Modifikation bisher bekannter Derivatisierungsverfahren eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen, um damit eine Umsetzung in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen möglich zu machen. In B.II.2. wurden erstmals dreibindige Phosphorverbindungen auf ihre Derivatisierungseigenschaften für die Gaschromatographie untersucht.

B. II. 1. Umsetzungen mit Phosphorhalogenverbindungen der Koordinationszahl 5

B. II. 1. 1. Umsetzung mit Methylthiophosphonsäuredichlorid in Gegenwart von Triäthylamin

In einer Variante des von Poole¹¹³⁾ beschriebenen Verfahrens (s. A. IV. 2.) sollte durch Ersatz der Äthylgruppe im Thio-phosphonsäuredichlorid durch die sterisch weniger anspruchsvolle Methylgruppe eine höhere Reaktivität und damit eine schnellere quantitative Umsetzung auch bei kleineren Ansätzen ermöglicht werden.

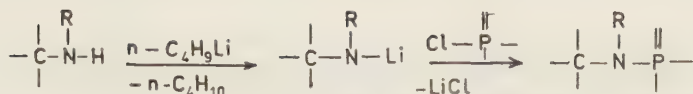
Wie sich bereits bei ersten Versuchen mit Pyrrolidin (s. C.IV. 1. 1.) und Ephedrin (s. C. IV. 1. 2.) zeigte, unterscheidet sich die Reaktivität nicht oder nur sehr wenig vom Äthylanalogen.



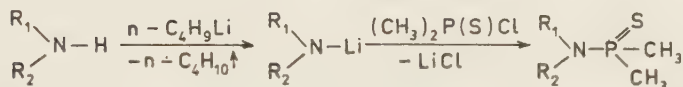
Die Umsetzungen müssen mit großem Thiophosphonsäuredichloridüberschuß und erhöhten Temperaturen durchgeführt werden. Auch nach 90-minütigem Erhitzen sind beim Ephedrin noch 15% unumgesetztes Ausgangsprodukt nachweisbar. Außerdem treten zahlreiche nicht identifizierte Nebenprodukte auf.

B. II. 1. 2. Umsetzungen mit Methylthiophosphonsäuredichlorid und Dimethylthiophosphinsäurechlorid nach Metallierung mit n-Butyllithium (s. C. IV. 2.)

Aus der präparativen phosphororganischen Chemie ist die Knüpfung von PN-Bindungen durch "Metallierung" des Amins mit Alkylolithiumverbindungen und die Umsetzung des entstandenen Lithiumamids mit Phosphorhalogeniden seit langem bekannt^{120-122).}



Übertragung dieses Reaktionsweges auf die Derivatisierung von sekundären Aminen mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid führte bei Raumtemperatur und kurzer Reaktionszeit quantitativ zu den erwarteten Verbindungen (s. C. IV.2.).



R₁, R₂ = Alkyl

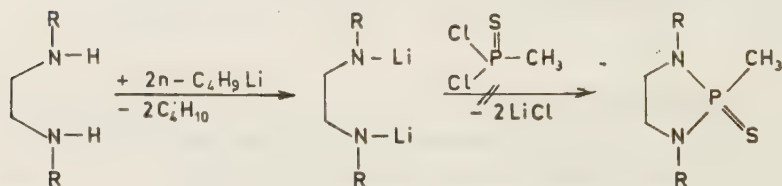
R ₁	R ₂	RT(min)	Exp.
CH ₃	C ₆ H ₅	3,4	C.IV.2.2
Si(CH ₃) ₃	Si(CH ₃) ₃	9,4	C.IV.2.3
OC ₂ H ₅	O-n-C ₃ H ₇	13,0	C.IV.2.4
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$		6,0	C.IV.2.1

Es wird fast kein Reagenzüberschuß benötigt, nachteilig ist jedoch die schlechte Handhabbarkeit von n-Butyllithium

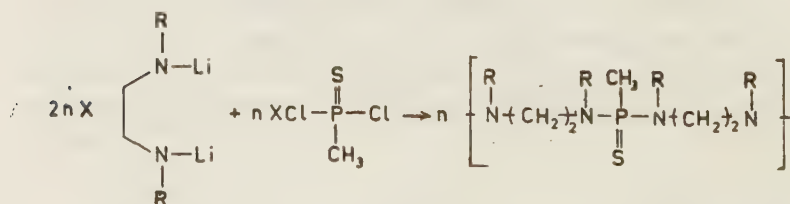
in kleinen Mengen, die eine genaue Dosierung unmöglich macht.

Die entstandenen Verbindungen sind thermisch und gegen Hydrolyse stabil und können gut gaschromatographisch mit dem Flammenionisationsdetektor bestimmt werden. Ihre Identifizierung erfolgt eindeutig mittels GC/MS-Kopplung.

Im Gegensatz zu den Umsetzungen von Monoaminen mit n-Butyllithium und Dimethylthiophosphinsäurechlorid führte die analoge Reaktion von Äthylendiamin und N,N'-Dimethyl-Äthylendiamin mit Methylthiophosphonsäuredichlorid zu keinen einheitlichen Verbindungen (s. C. V. 2. 5. u. 6.).



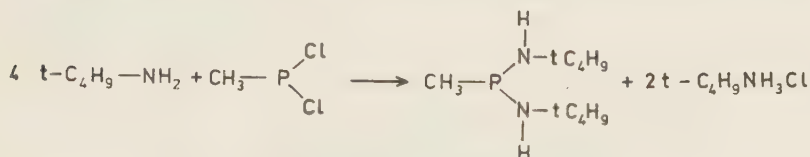
Vermutlich findet an Stelle einer intramolekularen Cyclisierung eine intermolekulare PN-Verknüpfung zu polymeren Produkten unterschiedlicher Kettenlänge statt.



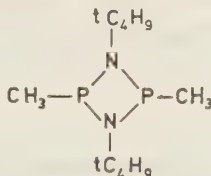
B. II. 2. Umsetzungen mit Phosphorhalogenverbindungen der Koordinationszahl 3

B. II. 2. 1. Darstellung und gaschromatographische Eigenschaften von Phosphonigsäurediamiden (C. IV. 3. 1. und IV. 3. 2.)

Um eine mögliche Anwendung der Derivatisierung zu Phosphonigsäurediamiden auf gaschromatographische Analyseverfahren zu überprüfen, wurde *t*-Butylamin mit Methylchlorphosphin derivatisiert.¹¹⁶⁾



Das entstehende Bis(*tert.*-butylamino)-methylphosphin wurde NMR-spektroskopisch identifiziert und zusammen mit dem nach der Literatur¹¹⁶⁾ im präparativen Maßstab synthetisierten Diazadiphosphetidin

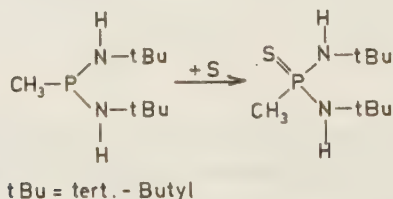


auf das gaschromatographische Verhalten untersucht.

Obwohl beide Verbindungen in NMR-spektroskopisch reiner Form vorliegen, wurde bei den angewandten GC-bedingungen kein einheitliches Chromatogramm erhalten. Es konnte weder die erwartete P(III)-Verbindung noch ein durch Luftsauerstoff oder Hydrolyse entstandenes Reaktionsprodukt zugeordnet werden.

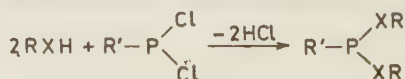
Bei Phosphor-Stickstoff-Verbindungen mit dreibindigem Phosphor erweist sich die PN-Bindung als offensichtlich nicht genügend stabil, um eine problemlose gaschromatographische Analyse zu ermöglichen.

Oxidiert man jedoch das Bis (tert.-butylamino)-methylphosphin vor der Injektion in den Gaschromatographen mit elementarem Schwefel, so erhält man das hydrolyse- und thermostabile Methylthiophosphonsäurederivat, das ausgezeichnet mit dem Flammenionisationsdetektor nachweisbar ist.



B. II. 2. 2. Umsetzungen mit Alkyldichlorphosphinen und Schwefel (s. C. IV. 3.)

Um sich einerseits die hohe Reaktivität dreibindiger Alkylphosphorhalogenide, andererseits die gute Chromatographierbarkeit von Thiophosphonsäureestern bzw. -amiden¹¹³⁾ für ein quantitatives Bestimmungsverfahren nutzbar zu machen, wurden die aus Alkoholen und Aminen mit Alkyldichlorphosphinen entstehenden Phosphonigsäureester bzw. -amide mit elementarem Schwefel zu den entsprechenden Thiophosphonsäurederivaten aufoxidiert.



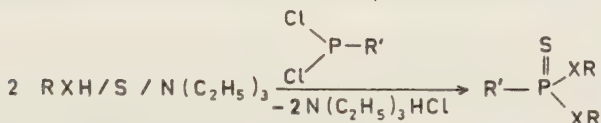


X = O, NH, NR

R' = Alkyl

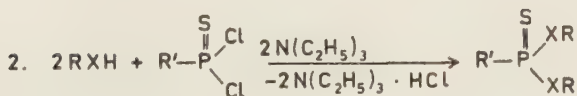
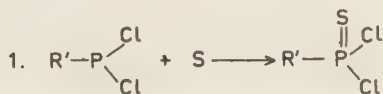
R = organischer Rest

Bei der praktischen Durchführung wird der Alkohol, das Amin oder die beide funktionellen Gruppen enthaltende Verbindung mit dem elementaren Schwefel und der Hilfsbase in Pentan vorgelegt und dann mit dem Alkyldichlorphosphin versetzt (s. C. IV. 3.).



R' = Alkyl

Ein dabei formal möglicher Reaktionsmechanismus über das Alkylthiophosphonsäuredichlorid nach



kann durch folgende Versuche und durch aus der Literatur bekannte Tatsachen ausgeschlossen werden.

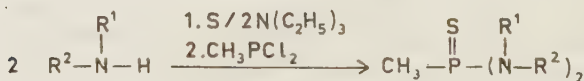
1. Zugabe des Schwefels erst nach der Reaktion des Alkyldichlorphosphins mit t-Butylamin und Ephedrin führt zu demselben Endprodukt (s. C. IV. 3. 1., C. IV. 3. 11., Lit. 23). Die primäre Reaktion zu den entsprechenden Phosphonig-säurederivaten wird durch heftige Wärmeentwicklung und Ausfallen des Triäthylaminohydrochlorids, im Falle des t-Butylamins auch NMR-spektroskopisch nachgewiesen (s. C. IV. 3. 1.).

2. Die Umsetzung mit Alkylthiophosphonsäuredichloriden benötigt bekanntermaßen drastischere Reaktionsbedingungen (s. Lit. 113).

3. Eine Oxidation von Alkyldichlorphosphinen mit Schwefel ist bei den angewandten Bedingungen nicht zu erwarten. Selbst das reaktive Methylchlorphosphin benötigt zur Synthese der Thioverbindung die Anwesenheit von Aluminiumchlorid als Katalysator (s. C. IV).

B. II. 2.2.1. Derivatisierung monofunktioneller Amine
(s. C. IV. 3. 2.-3.)

Mit dem neuen Verfahren wurden monofunktionelle primäre und sekundäre Amine im Verhältnis 2:1 derivatisiert.



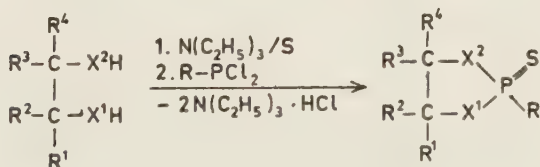
R ¹	R ²	RT (min.) (s. C. III.)
t-C ₄ H ₉	H	18,8
$ \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \diagup \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \quad \text{NH} - \end{array} $	-	13,1

Die nach kurzer Reaktionszeit bei Raumtemperatur entstandenen Derivate sind hydrolyse- und thermostabil und zeigen ausgezeichnete gaschromatographische Eigenschaften.

Wegen des schnellen und komplikationslosen Verlaufes der Reaktion sollte die Anwendung von Methyldichlorphosphin/Schwefel als Derivatisierungsreagenz für eine große Zahl weiterer Monoamine möglich sein.

B. II.2.2.2. Derivatisierung bifunktioneller Verbindungen
(s. C. IV. 3. 4.-19.)

Bifunktionelle Verbindungen reagieren mit Alkyldichlorphosphinen im Verhältnis 1:1.



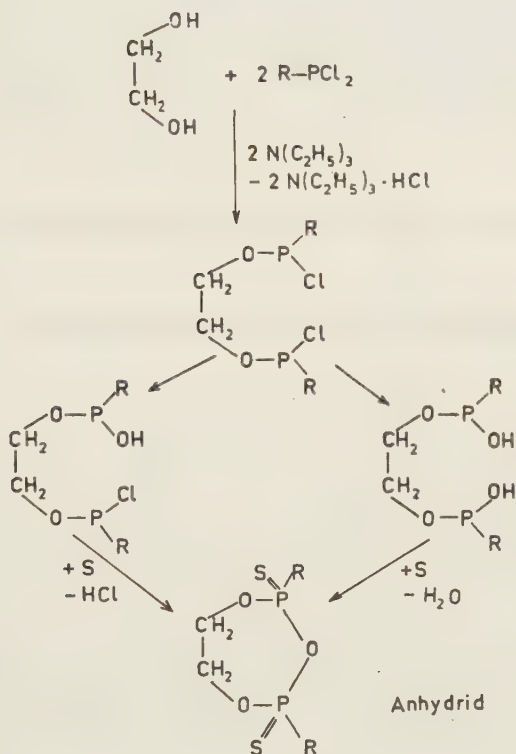
Nr.	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X ¹	X ²	RT(min)	NP(%)	Iso-V.	Exp.
1	tBu	H	H	H	H	NH	NH	8,9	-	-	C.IV.3-4.
2	tBu	H	H	H	H	O	O	6,3	38	-	C.IV.3.5.
3	tBu	H	H	H	H	NCH ₃	NCH ₃	8,9	-	-	C.IV.3.6.
4	tBu	H	H	H	H	O	NCH ₃	8,7	-	-	C.IV.3.7.
5	tBu	O	-	Phenylen	-	NH	NH	15,3	60	-	C.IV.3.8.
6	tBu	O	-	Phenylen	-	O	NH	12,7	-	-	C.IV.3.9.
7	tBu	O	H	H	CH ₃	O	NCH ₃	17,0/18,2	15	30:1	C.IV.3.13.-14.
8	CH ₃	O	H	H	CH ₃	O	NCH ₃	14,2	-	-	C.IV.3.10.-12.
8a	CH ₃	O	H	H	CH ₃	O	NCH D ₂	14,2	-	-	C.IV.3.10.
9	tBu	H	O	H	CH ₃	O	NCH ₃	16,2/17,2	2-5	6:2,8	C.IV.3.16.
10	CH ₃	H	O	H	CH ₃	O	NCH ₃	13,6/14,8	-	4,5:3,5	C.IV.3.15.
11	tBu	O	H	H	CH ₃	O	NH	16,3/17,0	10	2:1	C.IV.3.18.
12	CH ₃	O	H	H	CH ₃	O	NH	13,4/14,2	-	4,1:3,6	C.IV.3.17.
13	tBu	O-OCH ₂	H	H	H	O	N-1C ₃ H ₇	25,5/25,8	34	2,7:1,1	C.IV.3.19.

Tab. 1

NP = Nebenprodukt oder unumgesetztes Ausgangsprodukt

Iso-V. = Isomerenverhältnis

Bei der Umsetzung von Äthylenglykol mit t-Butyldichlorphosphin und Schwefel entstand in einer Nebenreaktion in 38%iger Ausbeute das Anhydrid (s. Abb. 15) das durch 1:2 Umsetzung, Hydrolyse einer oder beider verbleibenden Phosphorhalogenbindungen und anschließende intramolekulare Chlorwasserstoff- oder Wasserabspaltung gebildet wird.



Ein bislang nicht identifiziertes Nebenprodukt wurde bei der Derivatisierung des Propranolols nachgewiesen (13).

Während der größte Teil der Umsetzungen mit t-Butyldichlorphosphin/Schwefel bei den gewählten Bedingungen in kürzester Zeit quantitativ verlief, waren bei den Derivatisierungsreaktionen von Ephedrin (7), Pseudoephedrin (9) und Norephedrin (11) noch verschieden große Anteile unumgesetzten Ausgangsproduktes nachweisbar. Auch durch Verlängerung der Reaktionszeit oder Erhöhung der Temperatur wurde die Ausbeute nicht erhöht. Dagegen konnten sie mit dem reaktionsfähigeren Methyldichlorphosphin und Schwefel innerhalb von fünf Minuten sicher quantitativ derivatisiert werden; deshalb wurde das Methyldichlorphosphin bei den später folgenden quantitativen Bestimmungen (s. B. III) als Reagenz der Wahl angesehen.

B. II. 3. Eigenschaften der Alkylthiophosphonsäurederivate (1-13)

II. 3. 1. Chemische und thermische Eigenschaften

Die in II. 2. 2. 2. dargestellten Thiophosphonsäurederivate sind thermisch und gegen Hydrolyse stabil.

Sie lassen sich im Gaschromatographen in der heißen Zone des Detektors bei 240°C unzersetzt verdampfen. Mit überschüssigem Methanol ist in Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat als Säurefänger auch nach fünf Stunden noch keine Intensitätsabnahme des Derivates erkennbar. Das letztere gilt jedoch nur für die beschriebenen qualitativen Umsetzungen. Bei quantitativen Bestimmungen im Nanogrammbereich (s. B. III) ist eine erhebliche Intensitätsabnahme zu verzeichnen, weswegen auf eine Beseitigung unumgesetzten Alkyldichlorphosphins mit Methanol verzichtet wurde; dies erfolgt schonender durch die weitere Aufarbeitung mit ungetrocknetem Äther.

II. 3. 2. Gaschromatographische Eigenschaften

Die Alkylthiophosphonsäurederivate zeigen ausgezeichnete gaschromatographische Eigenschaften an Kapillarsäulen, belegt mit unpolaren stationären Phasen. Die Chromatogramme zeigen scharfe Peaks, die kein oder nur ein sehr geringes Tailing aufweisen.

Mit Ausnahme der Umsetzung von Ephedrin mit Methyldichlorphosphin/S führen die Derivatisierungsreaktionen der Ephedringruppe (7,9-12) sowie des Propranolols (13) zu zwei Signalen, wobei die Höhe des zweiten Peaks zwischen 3% (7) und 47% beträgt.

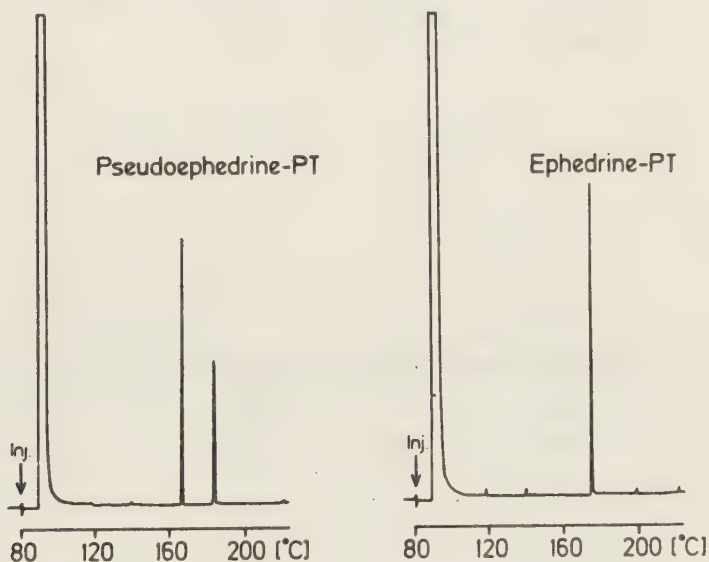
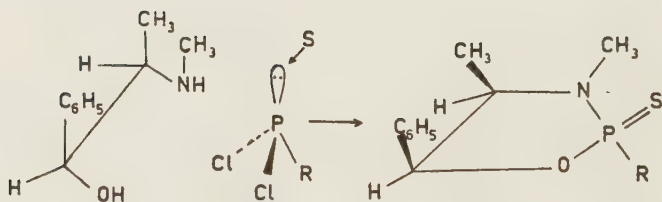
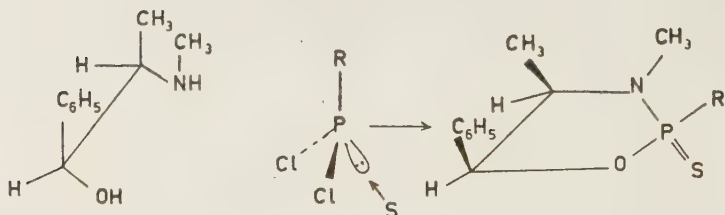


Abb. 1 Gaschromatogramme der Derivatisierung von Ephedrin (8) und Pseudoephedrin (10) mit Methyldichlorphosphin/S.

Durch GC/MS-Kopplung wurde der zweite Peak als Isomeres identifiziert (s. B. II. 3. 3.). Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Cooper et al²¹⁻²³⁾ überein. Es handelt sich dabei um Stereoisomere mit verschiedener Anordnung der Phosphorliganden, die durch einen unterschiedlichen stereospezifischen Angriff des Alkyldichlorphosphins entstehen.



II. 3. 3. Elektronenstoßionisations-Massenspektren der Alkylthiophosphorsäurederivate (s. C. I. 2.)

II. 3. 3. 1. Monoaminderivate (s. B. II. 2. 2. 1.)

Sowohl das Derivat des Pyrrolidins als auch das des t-Butylamins zeigen gut zuzuordnende Massenspektren.

Tab.2 Massenspektrum des Pyrrolidinderivates

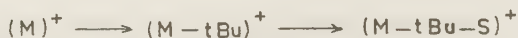
m/e	%	Zuordnung
218	15	M^+
148	13	$CH_3P(S)N \begin{array}{c} \diagup CH_2-CH_2^+ \\ \\ CH_2-CH_2 \end{array}$
116	69	$CH_3P N \begin{array}{c} \diagup CH_2-CH_2^+ \\ \\ CH_2-CH_2 \end{array}$
70	100	$N \begin{array}{c} \diagup CH_2-CH_2^+ \\ \\ CH_2-CH_2 \end{array}$

Tab.2a Massenspektrum des t-Butylaminderivates

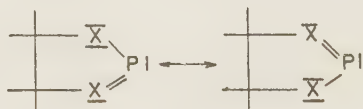
m/e	%	Zuordnung
222	100	M^+
151	25	$CH_3P(SH)HNtBu^+$
94	58	$CH_3P(SH)(NH)^+$
72	30	$C_4H_{10}N^+$
58	19	$C_3H_8N^+$

II.3. 3. 2. Derivate der bifunktionellen Verbindungen
(s. B. II. 2. 2. 2.)

Die Fragmentierungsschemata der cyclischen Verbindungen (1-6 in B. II. 2. 1.) zeigen alle einen gleichartigen Verlauf:



Die hohe Bildungstendenz der hochmolekularen Fragmente M^+-tBu bzw. $M^+-tBu-S$ kann zum einen durch die Stabilität und damit hohe Abspaltungstendenz des t-Butylradikals bzw. t-Butylkations, zum anderen durch eine mesomere Stabilisierung des Molekülrestes nach



erklärt werden.

Tab.3 Intensität der wichtigsten Massenwerte von 1-6
(s. Abb. 14 - 19 Anhang)

Nr.	M^+	$(M-tBu)^+$	$(M-tBuH)^+$	$(M-tBu-S)^+$	tBu^+
1	37	46	36	100	-
2	43	-	43	100	31
3	9	100	-	57	-
4	15	-	24	100	16
5	16	20	-	100	8
6	11	-	11	100	43

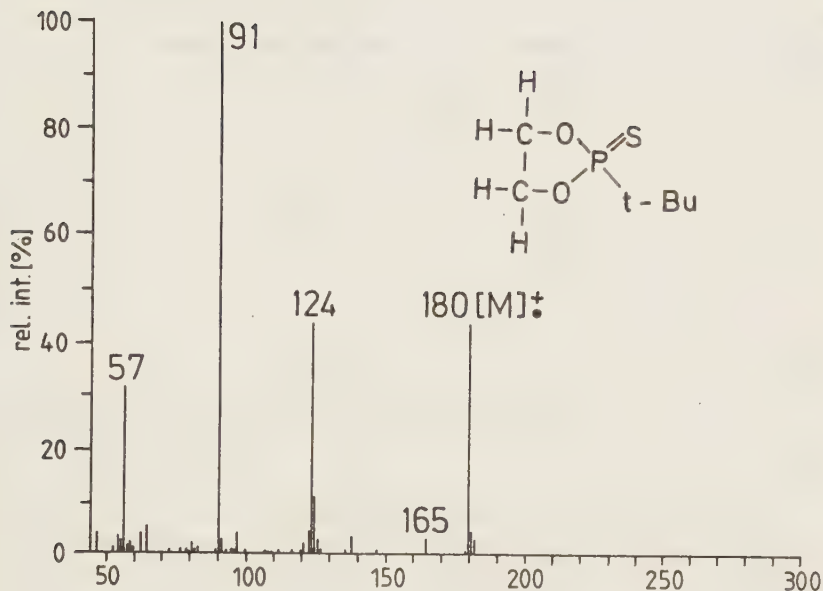


Abb. 2 EI-Massenspektrum des Äthylenglykol-Derivates (2)

3. 3. 3. Derivate der Ephedringruppe und des Propranolols (s. B. II. 2. 2. 2.)

Die isomeren t-Butyllderivate des Ephedrins, Pseudoephedrins und Norephedrins können anhand der Massenspektren eindeutig identifiziert werden. Alle Spektren weisen einen Molpeak auf. Während jedoch der Zerfall des im Gaschromatogramm zuerst auftretenden Isomeren (a) weitgehend dem der in B. II. 3.3.2. beschriebenen Modellverbindungen folgt - mit intensiven

$(M^+ - tBu)^+$ und $(M - tBu - S)^+$ - zeigt das zweite Isomere eine starke Zunahme niedermolekularer Fragmente, deren Zuordnung Schwierigkeiten bereitet und späteren Präzisionsmassenbestimmungen vorbehalten sein soll.

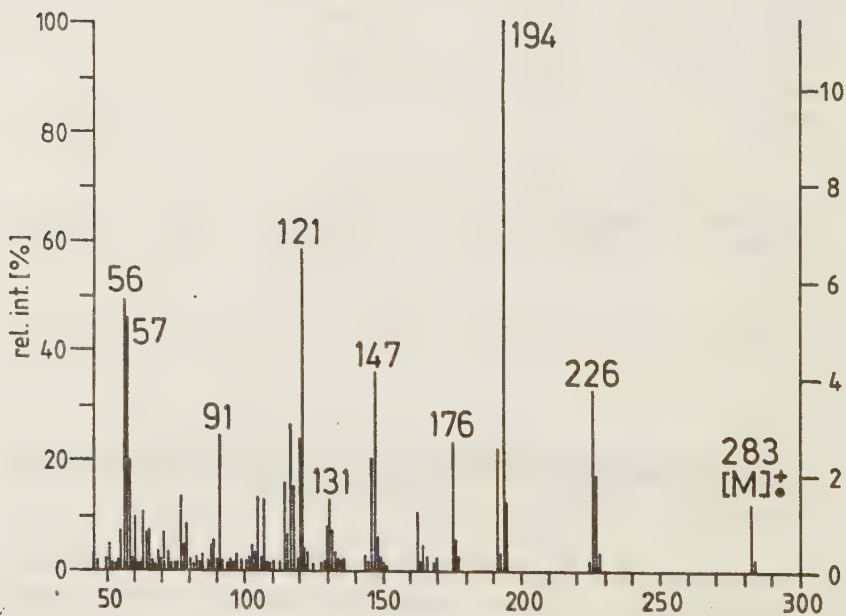
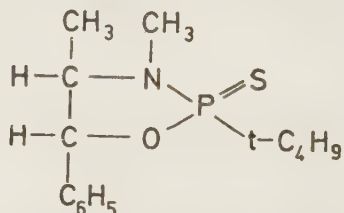


Abb. 3 EI-Massenspektrum des t-Butyl-Ephedrin-Derivates (7).

Tab.4 Intensität der wichtigsten Massenwerte von
7,9,11 (s. Abb.3 und Abb. 20 - 24 Anhang)

Nr.	M ⁺	(M-tBu) ⁺	⁺ (M-tBu-S) ⁺	M ⁺ -178	M ⁺ -162	tBu ⁺
7a	18	36	100	-	38	20
7b	26	10	-	100	-	-
9a	22	26	100	-	-	-
9b	10	17	100	-	92	97
11a	38	12	75	-	100	28
11b	10	6	29	-	97	100

Ein ähnliches Fragmentierungsverhalten zeigen die von Poole et al^[11] beschriebenen Äthyllderivate.

Einen komplexen Zerfallsmechanismus zeigen die Spektren der t-Butyl-Propranololderivate. Beide Isomere weisen einen intensiven Molpeak auf und unterscheiden sich nur im Intensitätsverhältnis der einzelnen Massenfragmente (s . Abb.26,27)

Einen völlig anderen Zerfallsweg weisen die Massenspektren der Derivatisierungsprodukte mit Methyldichlorphosphin (8, 10, 12) auf. Im Gegensatz zu den t-Butyl-Derivaten sind die erwarteten Fragmente $(M - CH_3)^+$ und $(M - CH_3 - S)^+$ praktisch nicht vorhanden. Die Spaltung scheint primär am Ring zu erfolgen. Man findet neben sehr intensiven Molekulationen die Massen $(M - 94)^+$, $(M - 106)^+$, und $(M - 121)^+$, die den Fragmenten $(M - CH_3P(S)(O))^+$, $(M - C_6H_5C(H)O)^+$ und $(M - C_6H_5C(H)O-CH_3)^+$ zugeordnet werden könnten. Eine eindeutige Zuordnung ist jedoch nur durch Präzisionsmassenbestimmungen möglich.

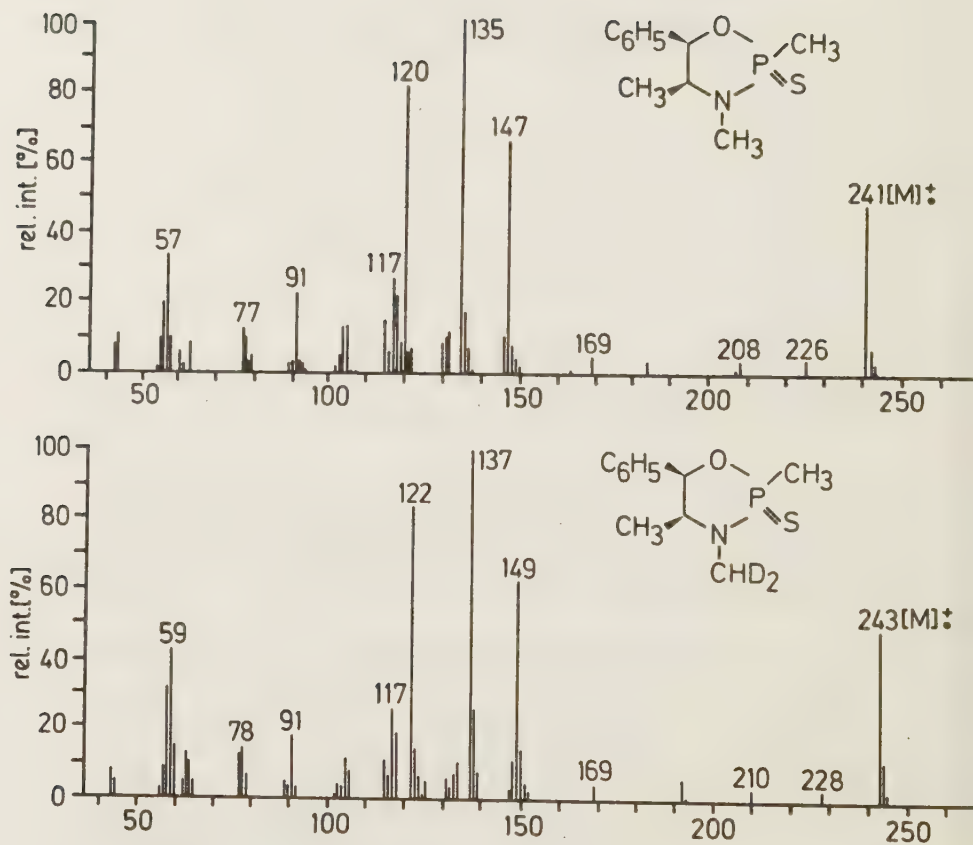
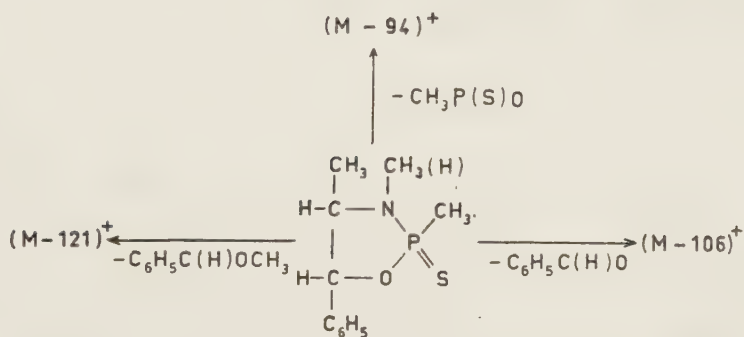


Abb. 4 Massenspektren des Ephedrin-Derivates (8) und des d₂-Ephedrin-Derivates (8a)

Im Gegensatz zu den t-Butylderivaten zeigen die P-Methyl-Isomeren (10, 12, a und b) nahezu identische Fragmentierungsmuster (s. Abb.22, 25 Anhang)

Tab. 5 Intensität der wichtigsten Massenwerte von 8, 10, 12

Nr.	M^+	$(M-94)^+$	$(M-106)^+$	$(M-121)^+$
8	94	72	84	57
10a	51	58	100	80
10b	68	58	100	73
12a	23	11	100	43
12b	32	13	100	39

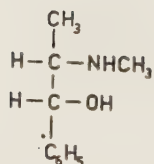


B. III. Anwendung der Derivatisierungsmethode mit Methyl-
dichlorphosphin/S auf die quantitative Bestimmung von Ephe-
drin

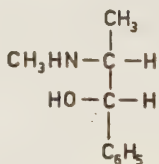
Um die Leistungsfähigkeit der Derivatisierung von bifunktionel-
len Verbindungen mit benachbarten Hydroxyl- und/oder Amino-
gruppen mit Methylchlorphosphin und Schwefel im Hinblick
auf eine mögliche klinisch-chemische Anwendbarkeit zu über-
prüfen, wurde ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung von
Ephedrin aus biologischem Material ausgearbeitet.

B. III. 1. Chemische und pharmakologische Eigenschaften von
Ephedrin⁴¹⁾

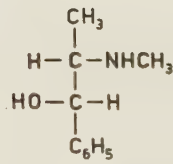
Ephedrin oder α -[1(Methylamino)äthyl]-Phenylmethanol wurde
in der chinesischen "Ma-Huang"-Droge, die aus verschiedenen
Ephedra-Arten gewonnen wird, aufgefunden. Es besitzt zwei
asymmetrische C-Atome, so daß außer den beiden Spiegelbild-
isomeren Ephedrinen ein zweites Antipodenpaar, die Pseudo-
ephedrine, existiert. Die beiden natürlich vorkommenden
Formen unterscheiden sich nur durch die Konfiguration an
der sekundären Alkoholgruppe.



D(-)-Ephedrin



L(+)-Ephedrin



L(+)-Pseudoephedrin

Ephedrin kann von seiner chemischen Struktur her als Grundkörper der direkt wirkenden Sympathikomimetika, der β -Sympathikolytika und der Katecholamine angesehen werden. Von daher kann die Ephedrinbestimmung wichtige Rückschlüsse auf mögliche Derivatisierungen einer Vielzahl pharmakologischer Verbindungen geben.

Seine leichte Handhabbarkeit und Verfügbarkeit und vor allen Dingen die relativ einfache Struktur ohne reaktive Gruppen am Phenylrest ließen es geeignet erscheinen, eine Bestimmungsmethode im Rahmen der für diese Arbeit gesetzten Zeit vollständig zu entwickeln. Zusätzliche funktionelle Gruppen mit reaktiven Wasserstoffatomen, wie sie bei den meisten Katecholaminen und einer Reihe von Sympathikomimetika und Sympathikolytika vorkommen, würden zunächst deren selektive Inaktivierung erfordern, was künftigen Untersuchungen vorbehalten sein soll.

Ephedrin und seine Homologen Norephedrin und Pseudoephedrin wirken über die Freisetzung von Noradrenalin aus den Speichervesikeln sympathomimetisch. Sie hemmen gleichzeitig die Wiederaufnahme von Noradrenalin an der Axonmembran und erhöhen dadurch zusätzlich dessen Konzentration an den adrenergen Rezeptoren. Wie die Amphetamine kann Ephedrin die Blut-Hirn-Schranke überwinden und vor allen Dingen durch Freisetzung von Noradrenalin und Dopamin zentralnervöse Wirkungen hervorrufen. Auf diesen pharmakologischen Eigenschaften beruht zum einen die therapeutische Anwendung als Arzneimittel, zum anderen der Mißbrauch des Ephedrins. Ephedrin ist aufgrund seiner peripheren bronchospasmolytischen Wirkung ein wichtiges Arzneimittel bei der Therapie der chronisch-obstruktiven Atemwegserkrankungen. Es ist zur Dauerbehandlung milder bronchospasmolytischer Zustände geeignet und daher u. a. Inhaltsstoff zahlreicher Hustensäfte. Es kann daneben auch als Mittel zur Abschwellung der Nasenschleimhaut und als Mydriatikum verwendet werden. Von manchen Autoren⁵³⁾ wird Ephedrin zur Therapie von Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Lokalanaesthetika gegeben.

Auf der amphetaminähnlichen zentralen Wirkung beruht der Mißbrauch des Ephedrins als Psychostimulans und Dopingmittel, weshalb die Ephedrinbestimmung schon seit langem Bestandteil jeder Dopinganalyse ist.

Sowohl periphere als auch zentrale Wirkungen unterliegen der Tachyphylaxie, d. h. dem Verlust der Wirksamkeit bei längerer hoher Dosierung.

Empfindliche und selektive quantitative Bestimmungsverfahren für Ephedrin und seine Homologen sind für pharmakokinetische Studien der Resorption, biologischen Verfügbarkeit, Distribution, Biotransformation, Exkretion und Elimination unerlässlich.

Außer der schon erwähnten Dopinganalyse findet sich als weiteres Anwendungsgebiet die gerichtsmedizinische Rückstandsanalyse bei Vergiftungen.

B. III. 2. Bekannte quantitative Bestimmungsverfahren

Aufgrund seiner vielfachen Anwendung ist die quantitative Bestimmung des Ephedrins seit vielen Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, die hier nur zum Teil erwähnt werden können¹⁴⁸⁾.

Der Schwerpunkt liegt bei weitem auf dem Gebiet der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie. Wenige andere Methoden wie Immunoassays¹⁴⁹⁾ und HPLC⁸³⁾ sind beschrieben, ihre bisher geringe Empfindlichkeit reicht jedoch nur für relativ grobe Bestimmungen aus.

Die ersten gaschromatographischen Verfahren zielten zunächst darauf ab, das Ephedrin nach Extraktion aus den biologischen wässrigen Medien mit organischen Lösungsmitteln direkt, d. h. ohne Derivatisierung zu bestimmen. Sowohl die Detektion mit dem ECD¹⁵⁰⁾ als auch mit N-spezifischen Detektoren^{15,107)} führte jedoch nicht in die gewünschten Empfindlichkeitsbereiche im Nano- oder gar Subnanogramm-Bereich.

Im weiteren Verlauf wurde versucht, durch Überführung des Ephedrins in geeignete Derivate eine Senkung der Nachweisgrenze zu erreichen.

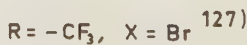
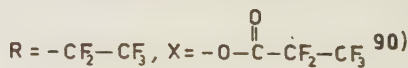
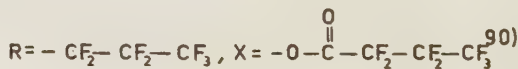
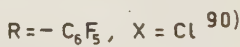
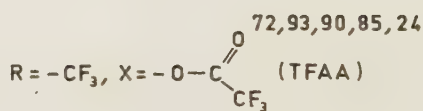
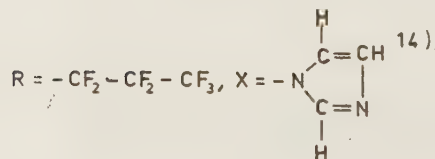
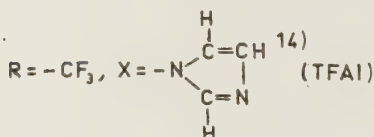
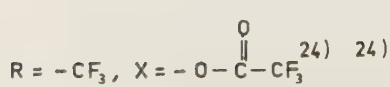
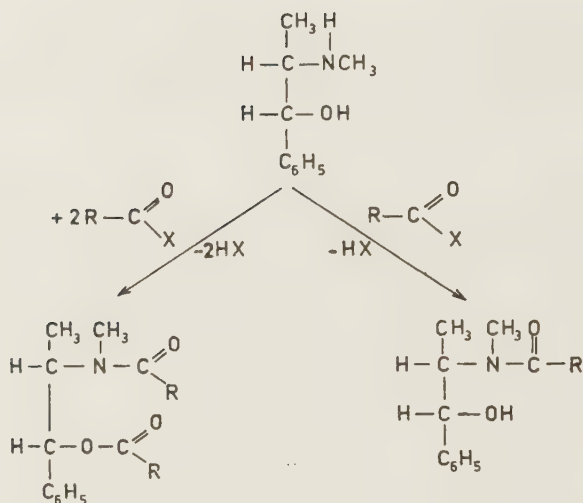
Die Trimethylsilylierung mit N, O-Bis-trimethylsilyl-acetamid (BSA) und N, O-Bis-trimethylsilyltrifluoracetamid (BSTFA) führt nur bis zu einer Nachweisgrenze von 2,5 µg¹³⁵⁾.



Wesentlich günstigere Ergebnisse erbrachte die Acylierung des Ephedrins mit perfluorierten Säurederivaten¹⁵¹⁾.

Die Acylierung erfolgt in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen selektiv am Stickstoff oder sowohl am Stickstoff als auch am Sauerstoff. Die Durchführung erfolgt in organischen Lösungsmitteln bei erhöhten Temperaturen.

Abb.5 Verschiedene Varianten der Acylierung des Ephedrins mit perfluorierten Säurederivaten (s. S. 55).



Die Derivatisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) wurde bereits 1973 von Kamei et al.⁷²⁾ beschrieben. Später untersuchten Midha et al.⁹⁰⁾ systematisch eine Reihe perfluorierter Acetylierungsmittel auf ihre Eigenschaften zur quantitativen gaschromatographischen Bestimmung des Ephedrins. Dabei wurde die 100 mal empfindlichere Nachweisbarkeit des N-Pentafluorobenzoylderivates gegenüber den anderen Perfluoracylverbindungen festgestellt. Nach der Extraktion aus dem Plasma mit Pentan und anschließender Umsetzung mit Pentafluorobenzoylchlorid kann das Ephedrin noch im unteren Nanogrammbereich mit dem ECD nachgewiesen werden.

Ähnlich empfindlich ist die Bestimmung von Pseudoephedrin und Norpseudoephedrin mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) nach Urin- oder Plasmaextraktion mit Toluol⁸⁵⁾.

Das Massenspektrometer als Detektor der gaschromatographischen Bestimmung des Ephedrins wurde bei vielen der aufgezählten Methoden zur Identifizierung der Peaks verwendet, nicht aber zur quantitativen Analyse. Für eine massenspektrometrische Detektion ist das Ephedrin selbst schlecht geeignet. Nach Untersuchungen von Barry und Petzinger⁴⁾ zeigt das über eine GC/MS-Kopplung gewonnene Massenspektrum keinen Molpeak und wenig intensive höhermolekulare Bruchstücke. Selbst über Direkteinlaß sind nur Spuren des Molpeaks zu finden. Demgegenüber sind die perfluoracylierten Derivate gut massenspektrometrisch detektierbar^{72,93)}.

Eine japanische Arbeitsgruppe⁹³⁾ arbeitete einen Dopingnachweis mittels GC/MS-Kopplung für Amphetamine und Ephedrin aus: Urinextraktion mit Äther, Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid und Nachweis des Derivates mittels GC/MS-Kopplung. Die Grenze für eine qualitative Bestimmung liegt bei 5-10 ng, Linearitätsbestimmungen sind nicht veröffentlicht.

B. III. 3. Quantitative Bestimmung von Ephedrin nach Derivatisierung mit Methylchlorphosphin/Schwefel

Wesentliche Voraussetzungen für die Eignung eines Derivatisierungsverfahrens zur Durchführung quantitativer Bestimmungen ist einerseits eine gute Reproduzierbarkeit bzw. Präzision, andererseits eine strenge Linearität der Umsetzung für den gewünschten Konzentrationsbereich. Die Präzision wird durch die Standardabweichung s oder den Variationskoeffizienten V_k , die Linearität durch den Korrelationskoeffizienten r ausgedrückt. Diese Faktoren wurden für das neue Derivatisierungsverfahren bestimmt, zunächst ohne vorherige Extraktion (s. B. III. 3. 3.), anschließend nach Extraktion aus Wasser, Urin und Serum (s. B. III. 3. 4.).

B. III. 3. 1. Detektion

Aus den Arbeiten von Jacob und Vogt⁶⁰⁾ ist die ausgezeichnete Detektion von Dimethylthiophosphinsäurederivaten mit dem Massenspektrometer bekannt. Wenn auch in Einzelfällen die Empfindlichkeit phosphorspezifischer Alkaliflammenionisationsdetektoren (AFID) bis zu einer Zehnerpotenz höher ist, so gestattet die Eigenschaft des Massenspektrometers, einzelne Massen spezifisch zu detektieren, eine quantitative Bestimmung der Derivate ohne dünnschichtchromatographische Vorreinigung. Da auch die Thiophosphonsäurederivate der Ephedrine (Nr. 7 - 12 in B. II. 2. 2.) Massenspektren mit charakteristischen intensiven Signalen aufweisen (s. B. II. 3. 3. 2.) war es naheliegend, dieses Detektionsverfahren für empfindliche Bestimmungen im Nano- und Subnanogrammbereich zu übernehmen. Aus wirtschaftlichen Überlegungen ist jedoch die Anwendung des Phosphordetektors für später vorgesehen.

Für die quantitativen Bestimmungen im Milli- und Mikrogrammbereich ist die Detektion mit dem Flammenionisationsdetektor (FID) ausreichend.

B. III. 3. 2. Interner Standard

Bei den Bestimmungen des Ephedrins im Milli- und Mikrogrammbereich mit dem FID wurde Pseudoephedrin als interner Standard eingesetzt. Da dieses bei der Umsetzung mit Methylchlorphosphin/Schwefel zu einem Isomerengemisch reagiert (s. B. II. 2. 2. 2.), wurde die Summe der Isomeren zur Bildung des Quotienten Peakhöhe Ephedrin : Peakhöhe Pseudoephedrin herangezogen.

Im Nanogrammbereich wurde D₂-Ephedrin mit zwei D-Atomen im N-Methyl-Rest als Standard verwendet. Der Einsatz der deuterierten Verbindung, der nur durch die hohe Selektivität der massenspektrometrischen Detektion möglich ist, garantiert weitgehend gleiches Verhalten des Standards bei Extraktion und Derivatisierung.

B. III. 3. 3. Quantitative Bestimmung von Ephedrin aus organischen Lösungsmitteln im Milli- und Mikrogrammbereich (s. C. V .)

Zur Bestimmung der Präzision wurde der Variationskoeffizient V_k bei drei verschiedenen Konzentrationen ermittelt (s. C. V.) . Die gefundenen Werte liegen in einem Bereich von 2,7 % bis 3,0 %.

Die Linearitätsmessungen erfolgten in drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen. Dabei wird ein Bereich von 0,02 mg bis 6,0 mg erfaßt (s. C. V. und Abb. 6-8)

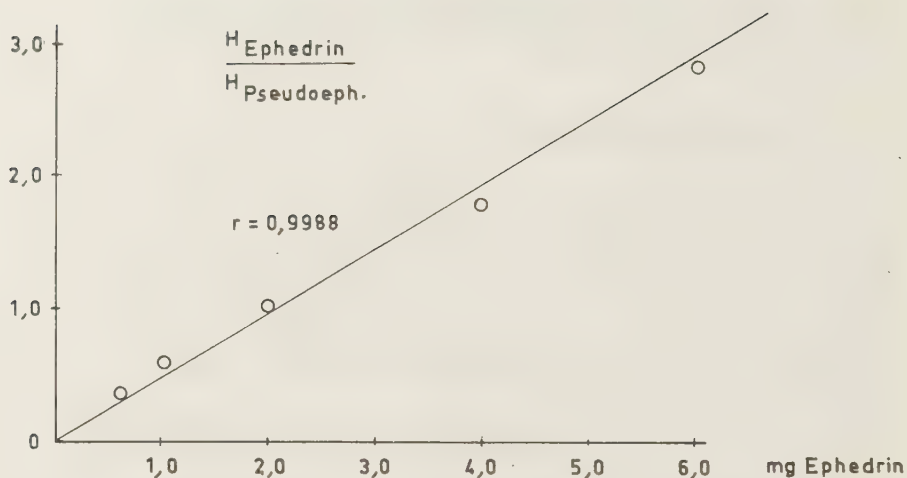


Abb. 6 Linearität der Bestimmung von Ephedrin mit Methyl-
dichlorphosphin/Schwefel im Bereich von 0,6 bis 6,0 mg.

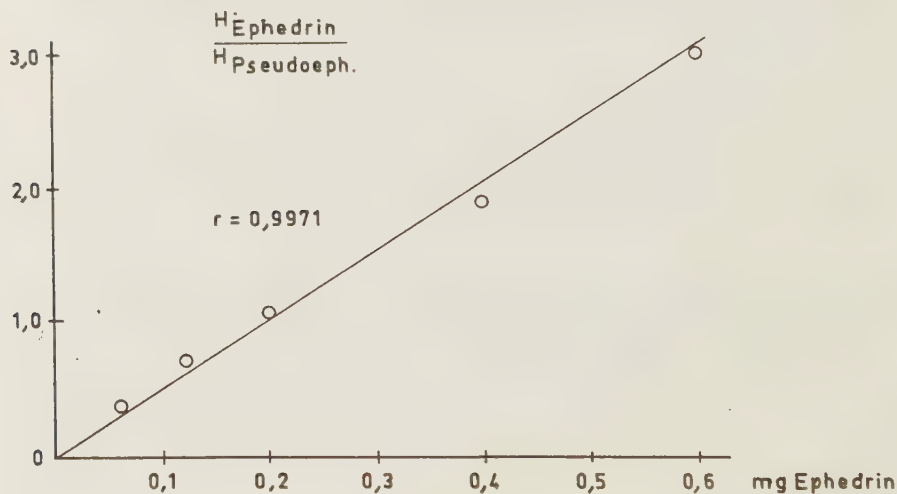


Abb. 7 Linearität der Bestimmung von Ephedrin mit Methyl-
dichlorphosphin/Schwefel im Bereich von 0,06 bis 0,6 mg.

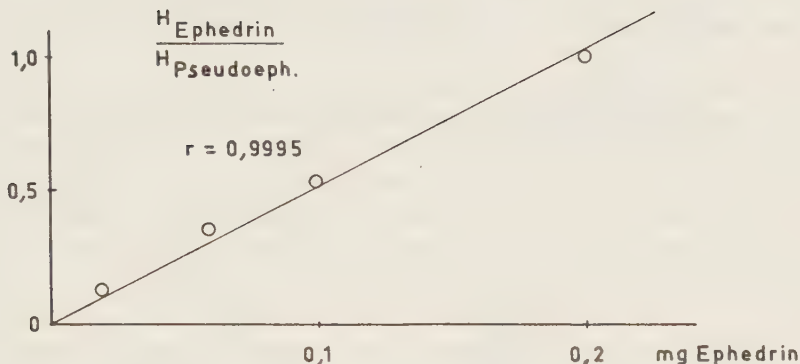


Abb. 8 Linearität der Bestimmung von Ephedrin mit Methyl-dichlorphosphin/Schwefel im Bereich von 0,02 bis 0,2 mg.

Die ermittelten Kurven zeigen nicht nur eine ausgezeichnete Linearität innerhalb jeder einzelnen Versuchsreihe, sondern auch eine sehr gute Korrelation untereinander, was auf eine außerordentlich gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens hinweist.

B. III. 3. 4. Quantitative Bestimmung von Ephedrin im Nanogramm-bereich nach Extraktion aus wässrigen Medien
(s. C. VI.)

B. III. 3. 4. 1. Extraktion (C. VI.)

Es wurden zwei in der Literatur beschriebene Verfahren erprobt. Bei der Extraktion mit Pentan in stark alkalischem Milieu nach Midha et al.⁹⁰⁾ erhielten wir aus nicht bekannten Gründen wesentlich geringere Signalintensitäten

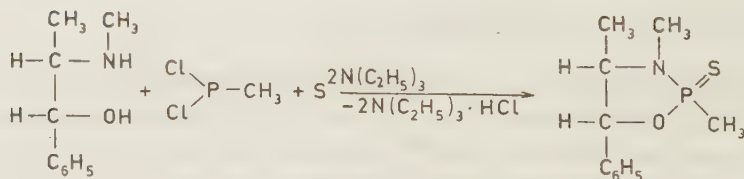
als nach dem älteren Verfahren mit Äther nach Pickup und Paterson¹⁰⁵⁾, weswegen wir letzteres bevorzugten. Dabei auftretende Neben- und Zersetzungsprodukte störten den Nachweis mit dem Massenspektrometer nicht.

Zur Bestimmung des Extraktionsverlustes wurde das Verhältnis Peakhöhe Ephedrin : Peakhöhe D₂-Ephedrin nach der angegebenen Methode bei definierten Konzentrationen bestimmt. Anschließend wurde die Bestimmung wiederholt, das Ephedrin jedoch erst nach der alleinigen Extraktion des D₂-Standards zugegeben.

Bei Vergleich der Quotienten erhält man eine Wiederfindung von 96% aus Wasser, 97% aus Urin und 92% aus Serum.

B. III. 3. 4. 2. Bestimmung von Ephedrin aus Wasser
(s. C. VI . 1.)

Ephedrin wurde zusammen mit D₂-Ephedrin als Standard aus der mit Ammoniumhydroxid alkalisierten Lösung mit Äther extrahiert, nach Abziehen des Lösungsmittels in Pentan aufgenommen und bei Raumtemperatur mit Methylchlorphosphin und Schwefel in Gegenwart von Triäthylamin als Hilfsbase umgesetzt (Analysenschema: s. C. VI . 1.).



Die Reaktion ist aufgrund der hohen Reaktivität des Methyldichlorphosphins auch bei den hier vorliegenden hohen Verdünnungen sofort quantitativ beendet. Überschüssiges Reagenz wird durch Spuren von Wasser im bei der Aufarbeitung verwendeten ungetrockneten Äther vernichtet.



Dabei auftretendes Chlorwasserstoffgas wird durch Natriumhydrogencarbonat abgefangen.



Die Thiophosphonsäurederivate des Ephedrins und des D₂-Ephedrins werden mit dem Massenspektrometer detektiert; die Werte für die Reproduzierbarkeit (Vk) und Linearität (r) sind aus Abb. 9 ersichtlich.

Die nach der Extraktion aus wässriger Lösung erhaltenen Parameter (Vk, r) unterscheiden sich kaum von denen der direkten Bestimmung aus organischen Lösungsmitteln, ein Hinweis für die gute Eignung des Derivatisierungsverfahrens für analytische Bestimmungen.

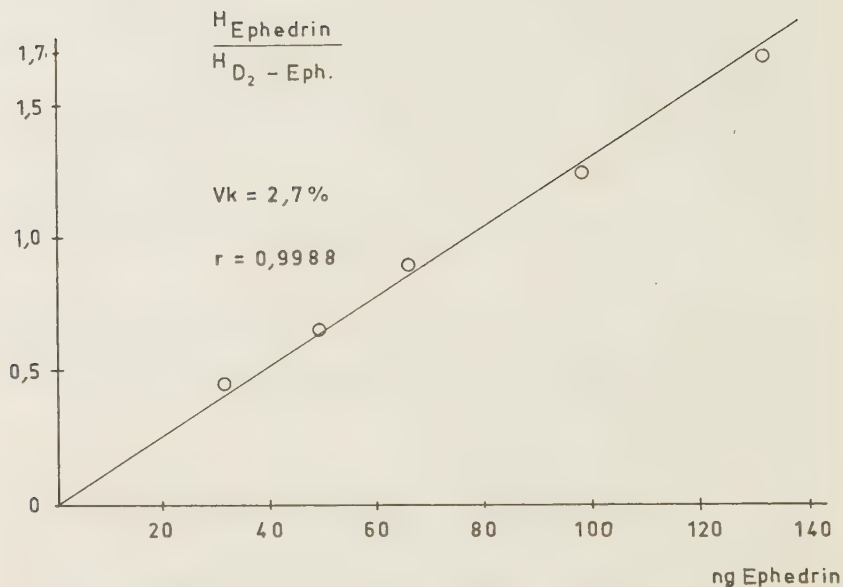


Abb. 9 Reproduzierbarkeit und Linearität der Bestimmung von Ephedrin aus Wasser (s. C. VI. 1.).

B. III. 3. 4. 3. Bestimmung von Ephedrin aus Urin
(s. C. VI. 2.)

Der quantitative Nachweis von Ephedrin aus Urin wird analog der Bestimmung aus Wasser durchgeführt (Analysenscheme: s. C. IV. 2.). Die Werte für die Reporduzierbarkeit (V_k) und die Lenearität (r) sind aus Abb. 10 ersichtlich.

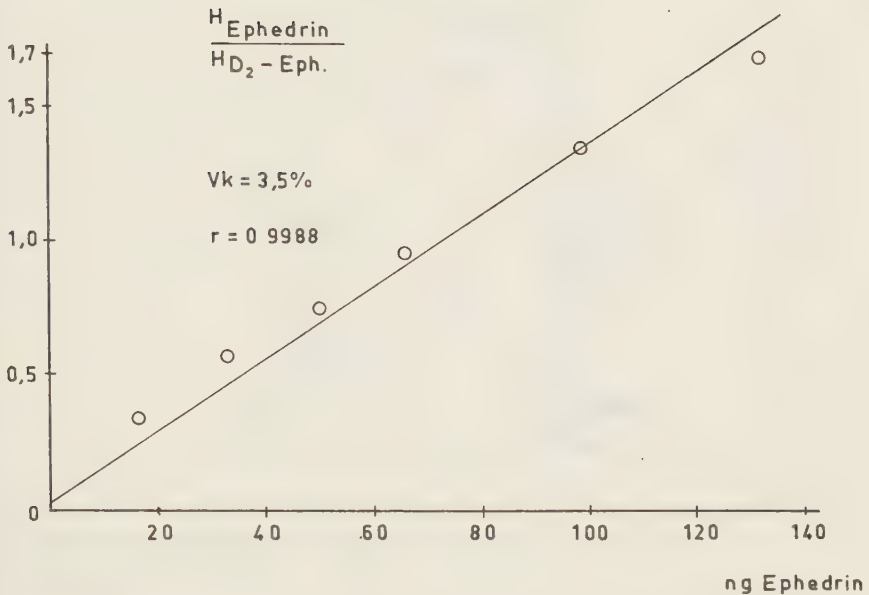


Abb.10 Reproduzierbarkeit und Linearität der Bestimmung von Ephedrin aus Urin (s. C. VI . 2.).

B. III. 3. 4. 4. Bestimmung von Ephedrin aus Serum
(s. C. VI . 3.)

Der quantitative Nachweis von Ephedrin aus dem Serum wurde analog der Bestimmung aus Wasser durchgeführt (Analysenschema: s. C. VI : 3.). Die Werte für die Reproduzierbarkeit (V_k) und die Linearität (r) sind aus Abb. 11 ersichtlich.

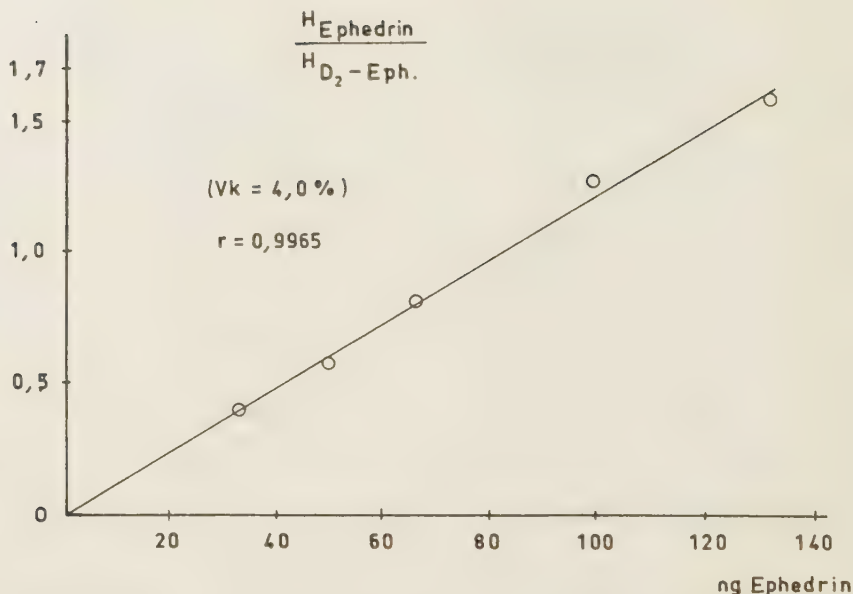


Abb. 11 Reproduzierbarkeit und Linearität der Bestimmung von Ephedrin aus Serum (s. C. VI. 3.)

Die Leistungsfähigkeit des neuen Derivatisierungsverfahrens wird vor allen Dingen bei der Bestimmung sehr kleiner Ephedrinmengen aus dem Serum deutlich (Abb. 12)

Aus der Signalintensität bzw. dem Signal/Rausch-Verhältnis der Bestimmung von 5 ng Ephedrinhydrochlorid, entsprechend 4 ng Ephedrin, kann man durchaus noch einen genauen quantitativen Nachweis von Ephedrin im Picogrammbereich (pg/ml Serum) erwarten, womit das Verfahren höchsten Anforderungen gerecht wird.

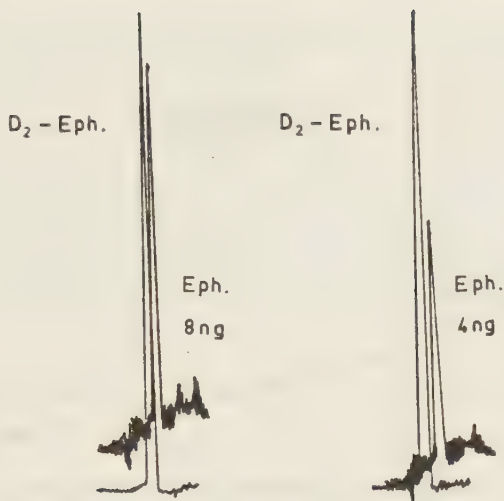


Abb. 12. Massenfragmentogramm bei der Bestimmung sehr kleiner Ephedrinmengen (8 ng, 4 ng)

Empfindlichkeit: für m/e 243 = 0,1 sec, 1 V

für m/e 241 = 0,1 sec, 0,3 V

B. III. 3. 4. 5. Klinische Anwendung der Derivatisierung mit Methyldichlorphosphin/Schwefel zur Bestimmung des Ephedrinspiegels (s. C. VI. 4.)

Bei einem gesunden, nüchternen, männlichen Probanden (Gewicht 77 kg) wurde der Ephedrinspiegel nach der Einnahme einer 50 mg-Dosis Ephedrinhydrochlorid (1 Tabl. Ephedrin Knoll) zu verschiedenen Zeiten bestimmt.

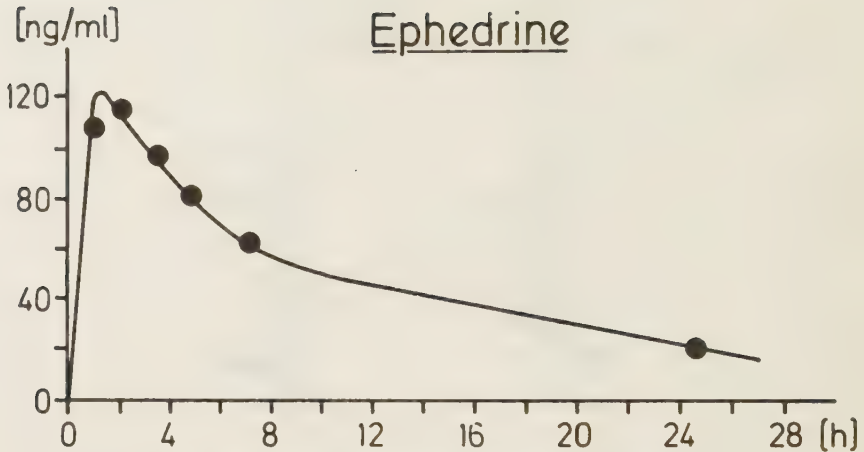


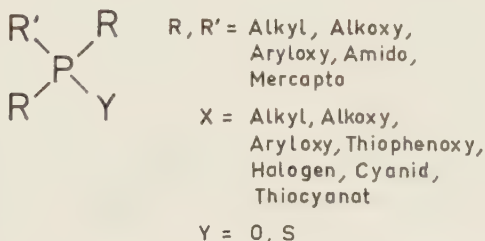
Abb.13 Ephedrinkingonzentration im Serum eines männlichen Probanden (77 kg) nach Einnahme einer 50 mg - Dosis Ephedrin (1 Tabl. Ephedrin Knoll^R) (s. C. VI . 4.).

Das Maximum der Ephedrinspiegelkurve liegt zwischen der ersten und zweiten Stunde (Midha et al.⁹⁰) 1 - 2 h). Die biologische Halbwertszeit im Serum beträgt etwa 5 1/2 Stunden (Midha et al.⁹⁰) 4,8 h). Da noch nach 24 h 45 min. 20,6 ng pro ml Serum gefunden werden, muß eine Zunahme der Halbwertszeit im Verlauf der Elimination angenommen werden, d. h. ein Einkompartimentmodell gilt nicht streng. Das Pharmakon strömt aus dem Blut zu Beginn schneller ab, da dabei nicht nur die Elimination, sondern auch die Verteilung zum Abstrom beiträgt.

B. IV. Zur Toxizität der Thiophosphonsäurederivate und des Methylchlorphosphins¹³¹⁾

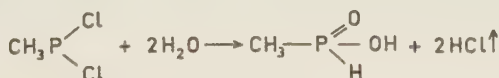
Verschiedene Organophosphorverbindungen werden als wirkungsvolle Kontakt-, Fraß- und Inhalationsgifte zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt. Sie wirken durch irreversible Hemmung der Cholinesterase, wodurch ein Abbau des Acetylcholins verhindert wird, was zu einer Acetylcholinvergiftung an den Rezeptoren vom Muscarintyp und von Nicotintyp führt.

Aufgrund der von Schrader¹²³⁾ aufgestellten Formel



müssen auch die dargestellten Thiophosphonsäurederivate als potentiell toxisch angesehen werden. Aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit ist jedoch eine Aufnahme über die Atemwege nicht zu befürchten, eher wegen ihrer guten Lipidlöslichkeit eine Resorption durch die Haut bei direkter Kontamination.

Die Toxizität des Methylchlorphosphins beruht in erster Linie auf der Säure- und Reizgaswirkung des Chlorwasserstoffs, der bei Berührung mit Spuren von Feuchtigkeit entweicht.



Von der dabei entstehenden Phosphonigen Säure ist keine größere Giftwirkung bekannt.

Trotz der für eine GC/MS - Analyse zu verwendenden geringen Konzentrationen sollte man zur Vermeidung möglicher gesundheitlicher Schäden alle Arbeiten mit Methyldichlorphosphin unter einem Abzug durchführen und den Hautkontakt mit den Reaktionslösungen vermeiden.

C. Experimenteller Teil

C. I. Apparative Ausstattung

C. I. 1. Gaschromatograph

Für alle qualitativen Bestimmungen sowie die quantitativen Analysen im Milli- und Mikrogrammbereich wurde ein Gaschromatograph Modell 1440 der Firma Varian, Palo Alto, Calif., USA, benutzt.

C. I. 2. Massenspektrometer

Sämtliche in dieser Arbeit aufgeführten EI-Massenspektren wurden mit dem doppelfokussierenden Massenspektrometer MAT 311 A der Firma Varian MAT, Bremen, BRD, bei einer Ionenenergie von 70 eV und einer Ionenquellentemperatur von 200°C unter Verwendung des Datensystems MAT SS 166 bzw. MAT 200 aufgenommen. Die Probenezufuhr erfolgte über eine offene GC/MS-Kopplung nach Henneberg et al. modifiziert nach Jacob et al.⁶⁰⁾

Detektion von M^+ _{Ephedrin-PS} (m/e = 241) und
 M^+ _{d₂-Ephedrin-PS} (m/e = 243)

HGT: 150°C	Ionenquellentemperatur: 160°C
SEV: 1,5 KV	Kanal 1: m/e 230,98564 (PFK)
Elektronenenergie: 70 eV	Kanal 2: m/e 241,0691 (M^+ _{Eph.})
Auflösung R = 1000	Kanal 3: m/e 243,08165 (M^+ _{d₂-Eph.})

C. I. 3. NMR-Gerät

Die Protonenresonanzspektren wurden mit einem Gerät "T 60A" der Firma Varian, Palo Alto, USA, aufgenommen. Interner Standard TMS.

C. II. Materialien

Folgende Substanzen wurden gemäß den angegebenen Literaturvorschriften hergestellt:

Methyldichlorphosphin^{102,103)}

t-Butyldichlorphosphin⁵⁷⁾

Methylthiophosphonsäuredichlorid^{103,57)}

Die als interner Standard verwendete Substanz D₂-Ephedrin wurde von der Firma E. Merck, Institut für experimentelle Arzneimittelforschung, Grafing, hergestellt.

Die übrigen verwendeten Ausgangsmaterialien waren vorrätig oder wurden im Handel erworben.

C. III. 1. GC-MS-Bedingungen für die qualitativen Bestimmungen (C. IV.) und die quantitativen Bestimmungen im Milli- und Mikrogrammbereich (C. V.)

Gerät: s. C. I. 1.

Säule: 25 m SE -30 Glaskapillarsäule (0,35 mm i. D.)
80 - 290° C, 8° C / Min.

Trärgas: N₂, 3 ml/min. (GC/MS: He, 3 ml/min.)

Splitverhältnis: 1 : 10

Injektor: 240° C

Detektor: FID, 270° C bzw. Massenspektrometer (s. C. I. 2.)

C. III. 2. GC-MS-Bedingungen für die quantitative Bestimmung des Ephedrins im Nanogrammbereich (C. VI.)

Gerät: s. C. I. 1.

Säule: 25 m SE - 30 Glaskapillarsäule (0,35 mm i. D.),
190° C isotherm

Trärgas: He, 3 ml/min.

Splitverhältnis: 1 : 7

Injektor: 240° C, Stufe 8

Detektor: MS (s. C. I. 2.)

Methoden

Derivatisierungsreaktionen und qualitative GC/MS - Bestimmungen

C. IV. 1. Umsetzungen mit Methylthiophosphonsäuredichlorid

C. IV. 1. 1. Derivatisierung von Pyrrolidin

Ansatz: 21,6 μmol

1,54 mg (21,6 μmol) Pyrrolidin in 1,0 ml Acetonitril werden mit 0,04 ml (55,1 mg = 680 μmol) Triäthylamin versetzt. Nach Zugabe von 20 mg (134 μmol) Methylthiophosphonsäuredichlorid wird 45 min. im verschlossenen und mit einer Klammer gesicherten Schliffröhrchen auf dem Wasserbad erhitzt.

Nach Abkühlen gibt man 10 mg Natriumhydrogenkarbonat sowie 0,05 ml Methanol zu, füllt mit Diäthyläther auf 2 ml Lösungsmenge auf und injiziert 1 μl .

GC/MS - Bedingungen: s. C. III.

Diese Reaktion verläuft quantitativ, unumgesetztes Ausgangsprodukt ist nicht nachweisbar.

C. IV. 1. 2. Derivatisierung von Ephedrin

Ansatz: 10,8 μmol

1,8 mg (10,8 μmol) (-) -Ephedrin in 1,0 ml Acetonitril
0,04 ml (55,1 mg = 680 μmol) Triäthylamin
20 mg (134 μmol) Methylthiophosphonsäuredichlorid

Durchführung: vgl. IV. 1. 1.

Verlauf: Auch nach 90 - minütigem Erhitzen sind noch 15% des Ausgangsproduktes massenspektrometrisch nachweisbar. Außerdem treten eine Reihe von nicht identifizierten Nebenprodukten auf.

C. IV. 2. Umsetzung nach Metallierung mit n-Butyllithium

C. IV. 2. 1. Derivatisierung von Pyrrolidin mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid

Ansatz: 16,3 μmol

1,16 mg (16,3 μmol) Pyrrolidin in 1 ml Diäthyläther werden mit 14,8 μl einer 1,6 n n-Butyllithiumlösung (Hexan) (237 μmol) versetzt. Die Reaktionslösung färbt sich unter heftiger Wärmeentwicklung und Gasfreisetzung gelb. Nach 15 min. wird eine Lösung von 3,1 mg (24 μmol) Diäthyläther zugetropft. Es fällt sofort Lithiumchlorid als weißer Niederschlag aus. Nach 20 - minütigem Stehenlassen wird vorsichtig im Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird erneut mit 2 ml Äther aufgenommen, 1 μl wird injiziert.

GC/MS - Bedingungen: s. C. III.

Die Reaktion verläuft quantitativ, unumgesetztes Ausgangsprodukt ist nicht nachweisbar.

C. IV. 2. 2. Derivatisierung von N-Methylanilin mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid

Ansatz: 10 μmol

1,08 μ l (1,07 mg/10 μ mol) N-Methylanilin in 1 ml Diäthyläther

14,8 μ l n-Butyllithium (1,6 n, Hexan) (23,7 μ mol)

3,1 mg (24 μ mol) Dimethylthiophosphinsäurechlorid in 1 ml Diäthyläther

Durchführung und Verlauf: vgl. IV. 2. 1.

C. IV. 2. 3. Derivatisierung von Bis(trimethylsilyl)amin mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid

Ansatz: 5 μ mol

0,807 mg (5 μ mol) Bis(trimethylsilyl)amin in 1 ml Diäthyläther

7,4 μ l n-Butyllithium (1,6 n, Hexan) (11,85 μ mol)

1,55 mg (12 μ mol) Dimethylthiophosphinsäurechlorid in 1 ml Diäthyläther

Durchführung und Verlauf: vgl. IV. 2. 1.

C. IV. 2. 4. Derivatisierung von $\text{HN}(\text{OC}_2\text{H}_5)(\text{O nC}_3\text{H}_7)$ mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid

Ansatz: 10 μ mol

1,14 mg (10 μ mol) $\text{HN}(\text{OC}_2\text{H}_5)(\text{O nC}_3\text{H}_7)$ in 1 ml Diäthyläther

14,8 μ l 1,6 n n-Butyllithium in Hexan (23,7 μ mol)

3,1 mg (24 μ mol) Dimethylthiophosphinsäurechlorid in 1 ml Diäthyläther

Durchführung und Verlauf: vgl. IV. 2. 1.

C. IV. 2. 5. Versuchte Derivatisierung von N,N'- Di-methyl-äthylendiamin mit Methylthiophosphonsäuredichlorid

Ansatz: 20 μmol

1,56 mg (20 μmol) N,N'- Dimethyl-äthylendiamin in 1,5 ml Diäthyläther werden mit 44,0 μl einer 1,6 n n-Butyllithiumlösung (in Hexan)(70,5 μmol) versetzt.

Die Reaktionslösung färbt sich unter heftiger Wärme- und Gasentwicklung gelb. Nach 15 Minuten wird eine Lösung von 5,37 mg (36 μmol) Methylthiophosphonsäuredichlorid in 1,5 ml Diäthyläther zugetropft. Es fällt sofort Lithiumchlorid als weißer Niederschlag aus. Nach 20-minütigem Stehenlassen wird vorsichtig im Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird erneut in 2,5 ml Äther aufgenommen. 1 μl wird injiziert.

GC/MS - Bedingungen: s. C. III.

Es wird kein einheitliches Gaschromatogramm erhalten. Wegen der Vielzahl von Signalen, die eine Anwendung in empfindlicheren Bereichen nahezu ausschließen, wird auf eine genauere Untersuchung der Reaktion verzichtet.

C. IV. 2. 6. Versuchte Derivatisierung von Äthylendiamin mit Methylthiophosphonsäuredichlorid

Ansatz: 20 μmol

1,06 mg (20 μmol) Äthylendiamin in 1,5 ml Diäthyläther
44,0 μl 1,6 n n-Butyllithiumlösung in Hexan (70,5 μmol)
5,37 mg (36 μmol) Methylthiophosphonsäuredichlorid in
1,5 ml Diäthyläther

Durchführung und Verlauf: s. C. IV. 2. 5.

C. IV. 3. Umsetzungen mit Alkyldichlorphosphinen

C. IV. 3. 1. Umsetzung von t-Butylamin mit Methyl- dichlorphosphin

(NMR-Spektrum, GC)

Ansatz: 0,199 mmol

Zu einer Lösung von 60 mg (0,82 mmol) t-Butylamin in 10 ml Pentan tropft man unter Kühlung mit einem Eis/Kochsalz-Gemisch und unter Schütteln 23,4 mg (0,199 mmol) Methyl-dichlorphosphin in 1,95 ml Pentan. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur werden 2 ml für die gaschromatographischen Untersuchungen abgetrennt. Der Rest wird unter Luftausschluß filtriert, mit Pentan gewaschen und das Filtrat im Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in Benzol aufgenommen und NMR - spektroskopisch analysiert.

^1H - NMR (Benzol): $\text{CH}_3(\text{P}) = - 1,16$ (d); $\text{CH}_3(\text{C}) = - 1,17$ (d);
 $^2\text{I}_{\text{PH}} = 6,9$ Hz; $^4\text{I}_{\text{PH}} = 0,75$ Hz;

Die Werte stimmen mit der Literatur¹¹⁶⁾ überein und beweisen die Existenz des Bis(tert.-butylamino)-methylphosphins als Reaktionsprodukt.

GC: 1 ul wird injiziert; Bedingungen s. C. I. 1.

Da kein einheitliches Gaschromatogramm erhalten wird, muß ein Zerfall des Reaktionsproduktes auf der Säule angenommen werden. Wegen der Vielzahl von Signalen, die eine Anwendung des Verfahrens ausschließen, wird auf eine Identifizierung der Spaltprodukte verzichtet.

Ein identisches Ergebnis erhält man bei dem nach der Literatur¹¹⁶⁾ hergestellten Diazadiphosphetidin ($\text{CH}_3\text{PN-tBu})_2$.

Oxidiert man jedoch das Bis(tert.-butylamino)-methylphosphin vor der Injektion in den Gaschromatographen mit elementarem Schwefel, so erhält man das erwartete Methylthiophosphonsäurederivat (s. C. IV. 3. 2.).

C. IV. 3. 2. Umsetzung von t-Butylamin mit Methyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 20 μmol

6 mg (82 μmol) t-Butylamin in 1,0 ml Pentan werden mit 10 mg Schwefel und 2,34 mg (20 μmol) Methyldichlorphosphin, gelöst in 0,19 ml Pentan, versetzt. Man läßt 10 Minuten stehen und engt dann vorsichtig im Wasserstrahlvakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wird in 3 ml Diäthyläther aufgenommen, 1 μl wird injiziert.

GC/MS - Bedingungen: s. C. III.

Die Reaktion verläuft quantitativ, unumgesetztes Ausgangsprodukt ist nicht nachweisbar.

C. IV. 3. 3. Derivatisierung von Pyrrolidin mit Methyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 19 μmol

1,35 mg (19 μmol) Pyrrolidin in 1 ml Pentan werden mit 20 mg Schwefel und 0,3 ml Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /10 ml Pentan) vorgelegt. Nach Zugabe

von 1,16 mg (10 μ mol) Methyldichlorphosphin in 0,1 ml Pentan läßt man 10 Minuten stehen. Dann fügt man 10 mg Natriumhydrogencarbonat zu und engt vorsichtig im Wasserstrahlvakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wird in 2 ml Äther aufgenommen, 1 μ l wird injiziert.

GC/MS - Bedingungen: s. C. III.

Die Reaktion verläuft quantitativ, unumgesetztes Ausgangsprodukt ist nicht nachweisbar.

C. IV. 3. 4. Derivatisierung von Äthylendiamin mit
t-Butyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 20 μ mol

1,2 mg (20 μ mol) Äthylendiamin, 20 mg Schwefel und 0,15 ml 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /10 ml Pentan) werden mit 1 ml Äthylenglykoldimethyläther als Lösungsmittel vorgelegt. Nach Zugabe von 3,8 mg (22 μ mol) t-Butyldichlorphosphin in 0,3 ml Pentan wird umgeschüttelt, dann 30 Minuten stehen gelassen. Anschließend werden 10 mg Natriumhydrogencarbonat hinzugefügt und die Reaktionslösung auf 2 ml mit Diäthyläther aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren des überschüssigen Schwefels und des ausgefallenen Triäthylaminhydrochlorids wird 1 μ l injiziert.

GC/MS - Bedingungen: s. C. III.

Die Reaktion verläuft quantitativ, unumgesetztes Ausgangsprodukt ist nicht nachweisbar.

C. IV. 3. 5. Derivatisierung von Äthylenglykol mit
t-Butyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 20 μ mol

1,2 mg (20 μ mol) Äthylenglykol in 1 ml Äthylenglykoldimethyläther

20 mg Schwefel

0,15 ml 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /10 ml Pentan)

3,8 mg (22 μ mol) t-Butyldichlorphosphin in 0,3 ml Pentan.

Durchführung: s. C. IV. 3. 4.

GC/MS - Bedingungen: s. C. III. 1.

Neben einem Hauptpeak bei 6,3 Minuten (62%) wird bei dieser Umsetzung im Gaschromatogramm noch ein weiterer Peak bei 16,0 Minuten (38%) gefunden. Mit Hilfe des Massenspektrums wird dieser Peak als Anhydrid (s. S. 39) identifiziert, das durch 1 : 2 - Umsetzung, Hydrolyse und intramolekulare Wasserabspaltung entsteht.

(Massenspektrum: s. Abb. 15 Anhang)

C. IV. 3. 6. Derivatisierung von N,N' - Dimethyl-
Äthylendiamin mit t-Butyldichlorphosphin/S

Ansatz: 20 μ mol

1,76 mg (20 μ mol) N,N' - Dimethyl-Äthylendiamin in 1 ml Äthylenglykoldimethyläther

20 mg Schwefel

0,15 ml 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /10 ml Pentan)

3,8 mg (22 μ mol) t-Butyldichlorphosphin in 0,3 ml Pentan.

Durchführung und Verlauf: s. C. IV. 3. 4.

C. IV. 3. 7. Derivatisierung von 2-(N-methylamino)-
Äthanol mit t-Butyldichlorphosphin/S

Ansatz: 20 μ mol

1,51 mg (20 μ mol) 2-(N-methylamino)-Äthanol in
1 ml Äthylenglykoldimethyläther
20 mg Schwefel
0,15 ml Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /10 ml Pentan)
3,8 mg (22 μ mol) t-Butyldichlorphosphin in 0,3 ml Pentan

Durchführung und Verlauf: s. C. IV. 3. 4.

C. IV. 3. 8. Derivatisierung von o-Phenylendiamin mit
t-Butyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 20 μ mol

2,16 mg (20 μ mol) o-Phenylendiamin in 1 ml Äthylen-
glykoldimethyläther
20 mg Schwefel
0,15 ml Triäthylaminlösung (1 m, 1,37 ml NEt_3 /10 ml Pentan)
3,8 mg (22 μ mol) t-Butyldichlorphosphin in 0,3 ml Pentan

Durchführung: s. C. IV. 3. 4.

Bei den gewählten Bedingungen verläuft die Reaktion nicht quantitativ. Die Ausbeute beträgt nur 40%. Neben dem gewünschten Produkt werden im Gaschromatogramm noch 60% des Ausgangsproduktes gefunden.

C. IV. 3. 9. Derivatisierung von o-Aminophenol mit
t-Butyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 20 μ mol

2, 16 mg (20 μmol) o-Aminophenol in 1 ml Äthylenglykol-
dimethyläther
20 mg Schwefel
0,15 ml Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /10 ml Pentan)
3,8 mg (22 μmol) t-Butyldichlorphosphin in 0,3 ml Pentan

Durchführung: s. C. IV. 3. 4.

C. IV. 3. 10. Derivatisierung von (-)-Ephedrin mit
Methyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 6 μmol

1,0 mg (6 μmol) (-)-Ephedrin⁺ in 1 ml Pentan,
20 mg Schwefel und 0,1 ml 1 m Triäthylaminlösung (100 μmol)
werden vorgelegt. Nach Zugabe von 2,8 mg (15 μmol)
Methyldichlorphosphin in 0,15 ml Pentan wird 2 Minuten
geschüttelt, dann 5 Minuten stehen gelassen. Anschließend
werden 10 mg Natriumhydrogencarbonat hinzugefügt und die
Reaktionslösung auf 2 ml mit ungetrocknetem Diäthyläther
aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren wird 1 μl injiziert.

GC/MS - Bedingungen: s. C. III.

C. IV. 3. 11. Umsetzung von (-)-Ephedrin mit Methyl-
dichlorphosphin

Ansatz: 6 μmol

1,0 mg (6 μmol) (-)-Ephedrin in 1 ml Pentan und
0,1 ml (100 μmol) 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /
10 ml Pentan) werden mit 1 ml Pentan vorgelegt. Nach Zugabe
von 1,8 mg (15 μmol) Methyldichlorphosphin in 0,15 ml

⁺ eigentlich 1,07 mg 7% Kristallwasser enthaltendes
(-)-Ephedrin

Pentan wird 2 Minuten geschüttelt, dann 5 Minuten stehen gelassen. Anschließend werden 10 mg Natriumhydrogencarbonat hinzugefügt und die Reaktionslösung auf 2 ml mit ungetrocknetem Diäthyläther aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren wird 1 μ l injiziert.

GC/MS - Bedingungen: s. C. III.

Da kein einheitliches Gaschromatogramm erhalten wird, muß ein Zerfall des Produktes auf der Säule angenommen werden. Wegen der Vielzahl der Signale wird auf eine Identifizierung der Spaltprodukte verzichtet.

Gibt man jedoch vor der Injektion 20 mg Schwefel zum Reaktionsgemisch, so wird das erwartete Methylthiophosphonsäurederivat erhalten.

C. IV. 3. 12. Derivatisierung von (+)-Ephedrinhydrochlorid mit Methyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 6 μ mol

1,21 mg (6 μ mol) (+)-Ephedrinhydrochlorid in 1 ml Pentan
20 mg Schwefel

0,15 ml (150 μ mol) 1 M Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 / 10 ml Pentan)

1,8 mg (15 μ mol) Methyldichlorphosphin in 0,1 ml Pentan
(0,1 ml Methyldichlorphosphin/10 ml Pentan)

Durchführung und Verlauf: s. C. IV. 3. 10.

C. IV. 3. 13. Derivatisierung von (-)-Ephedrin mit t-Butyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 12 μ mol

2,0 mg (12 μmol) (-)-Ephedrin in 1 ml Äthylenglykoldimethyläther, 20 mg Schwefel und 0,15 ml (150 μmol) 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /10 ml Pentan) werden vorgelegt. Nach Zugabe von 2,8 mg (17,6 μmol) t-Butyldichlorphosphin in 0,15 ml Pentan wird umgeschüttelt, dann 45 Minuten bei 60-70 °C erhitzt. Anschließend werden 10 mg Natriumhydrogencarbonat hinzugefügt und die Reaktionslösung auf 3 ml mit ungetrocknetem Diäthyläther aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren des entstandenen Triäthylaminhydrochlorids und des unumgesetzten Schwefels wird 1 μl injiziert.

GC/MS - Bedingungen: s. C. III.

Die Reaktion verläuft bei diesen Bedingungen nicht quantitativ. Neben dem gewünschten Produkt werden noch 10 - 20 % des Ausgangsproduktes (RT = 7,2 min.) wiedergefunden. Auch eine Verlängerung der Reaktionsdauer bringt keine Vergrößerung der Ausbeute.

C. IV. 3. 14. Derivatisierung von (+)-Ephedrin mit
t-Butyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 15 μmol

2,5 mg (15 μmol) (+)-Ephedrinhydrochlorid in 1 ml
Äthylenglykoldimethyläther
20 mg Schwefel
0,15 ml (150 μmol) 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /
10 ml Pentan)
2,8 mg (17,6 μmol) t-Butyldichlorphosphin in 0,15 ml
Pentan

Durchführung und Verlauf: s. C. IV. 3. 13.

C. IV. 3. 15. Derivatisierung von Pseudoephedrin mit
Methyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 6 μmol

1,0 mg (6 μmol) Pseudoephedrin in 1 ml Pentan

20 mg Schwefel

0,15 ml (150 μmol) 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /
10 ml Pentan)

1,8 mg (15 μmol) Methyldichlorphosphin in 0,1 ml Pentan
(0,1 ml Methyldichlorphosphin/10 ml Pentan)

Durchführung und Verlauf: s. C. IV. 3. 10.

C. IV. 3. 16. Derivatisierung von Pseudoephedrin mit
t-Butyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 6 μmol

1,0 mg (6 μmol) Pseudoephedrin in 1 ml Äthylenglykol-
dimethyläther

20 mg Schwefel

0,1 ml (100 μmol) 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /
10 ml Pentan)

1,4 mg (8,8 μmol) t-Butyldichlorphosphin in 0,75 ml
Pentan

Durchführung: s. C. IV. 3. 13.

C. IV. 3. 17. Derivatisierung von Norephedrinhydrochlorid
mit Methyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 6 μmol

1,13 mg (6 μmol) Norephedrinhydrochlorid in 1 ml Pentan
20 mg Schwefel
0,15 ml (150 μmol) 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /
10 ml Pentan)
1,8 mg (15 μmol) Methyldichlorphosphin in 0,1 ml Pentan
(0,1 ml Methyldichlorphosphin/10 ml Pentan)

Durchführung: s. C. IV. 3. 10.

C. IV. 3. 18. Derivatisierung von Norephedrinhydrochlorid
mit t-Butyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 12 μmol

1,26 mg (12 μmol) Norephedrinhydrochlorid in 1 ml
Äthylenglykoldimethyläther
20 mg Schwefel
0,15 ml (150 μmol) 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /
10 ml Pentan)
2,8 mg (17,6 μmol) t-Butyldichlorphosphin in 0,15 ml Pentan

Durchführung: s. C. IV. 3. 13.

Die Reaktion verläuft unter den gewählten Bedingungen nicht quantitativ. Es werden ca. 10% des Ausgangsproduktes wiedergefunden ($\text{RT} = 7,2 \text{ min.}$). Auch eine Verlängerung der Reaktionsdauer bringt keine Vergrößerung der Ausbeute.

C. IV. 3. 19. Derivatisierung von Propranololhydrochlorid
mit t-Butyldichlorphosphin/Schwefel

Ansatz: 27 μmol

7,11 mg (27 μmol) Propranolol-HCl in 1,5 ml Äthylen-
glykoldimethyläther

20 mg Schwefel

0,32 ml (320 μmol) 1 M Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /
10 ml Pentan)

5,2 mg (32,7 μmol) t-Butyldichlorphosphin in 0,3 ml Pentan

Durchführung: s. C. IV. 3. 13.

Die Reaktion verläuft unter den gewählten Bedingungen nicht quantitativ. Außer der als Isomerengemisch (Verhältnis 2,7 : 1,1) auftretenden gewünschten Verbindung tritt noch ein von uns nicht identifiziertes Produkt (RT : 15,8 min.) auf (34%).

Die Reaktionsbedingungen wurden bislang nicht variiert.

Die Detektion der entstandenen Verbindungen ist nur mit dem FID gut. Massenspektrometrisch sind nur Spuren nachweisbar, die jedoch zur Identifizierung der Propranolol-derivate ausreichen.

Eine Derivatisierung von Propranolol mit Methylchlorphosphin/Schwefel wurde bislang noch nicht durchgeführt und ist ebenso wie die Umsetzung weiterer β -Blocker zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

C. V. Quantitative Bestimmungen von Ephedrin im Milli- und Mikrogrammbereich

Interner Standard

Bei den Bestimmungen mit dem FID wird Pseudoephedrin als interner Standard eingesetzt. Da dieses bei der Umsetzung mit Methylchlorphosphin/Schwefel zu einem Isomerengemisch reagiert (s. B. II. 2. 2. 2.) wird die Summe der Isomeren zur Bildung des Quotienten Peakhöhe Ephedrin:Peak-

höhe Pseudoephedrin herangezogen.

Durchführung:

Die Durchführung erfolgt analog IV. 3. 10. mit den unten angegebenen Ansätzen.

Bestimmung des Variationskoeffizienten V_k

Ephedrin		Pseudoephedrin		Ansätze	V _k
mg	μmol	mg	μmol		
1,17	7,0	1,08	6,5	8	2,9
0,3	1,8	0,1	0,6	6	3,0
1,5	9,1	1,08	6,5	8	2,7

(-)-Ephedrin + Pseudoephedrin in 1,5 ml Pentan

20 mg Schwefel

0,2 ml (200 μmol) 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml/
10 ml Pentan)

5,4 mg (45 μmol) Methyldichlorphosphin in 0,3 ml Pentan
(0,1 ml Methyldichlorphosphin in 10 ml Pentan)

Bestimmung der Linearität

Ephedrin		Pseudoephedrin		$\frac{H_{\text{Ephedrin}}}{H_{\text{Pseudoeph.}}}$
mg	μmol	mg	μmol	
0,6	3,6	1,0	6,0	0,35
1,0	6,0	"	"	0,51
2,0	12,0	"	"	1,02
4,0	24,0	"	"	1,80
6,0	36,0	"	"	2,82

$$r = 0,9988$$

mg	μmol	mg	μmol	
0,06	0,36	0,10	0,60	0,39
0,12	0,72	"	"	0,66
0,20	1,20	"	"	1,07
0,40	2,40	"	"	1,85
0,60	3,60	"	"	3,01

$$r = 0,9971$$

0,02	0,12	0,10	0,60	0,12
0,06	0,36	"	"	0,35
0,10	0,60	"	"	0,53
0,20	1,20	"	"	1,08

$$r = 0,9995$$

(-)-Ephedrin + Pseudoephedrin in Diäthyläther

20 mg Schwefel

0,4 ml (400 μmol) Triäthylaminlösung (1,37 ml/10 ml Pentan)

10,8 mg Methylchlorphosphin in 0,6 ml Pentan

(0,1 ml Methylchlorphosphin/10 ml Pentan)

Durchführung: s. C. IV. 3. 10.

C. VI. Quantitative Bestimmung von Ephedrin im Nanogramm-
bereich nach Extraktion aus wäßrigen Medien

Interner Standard

Bei den Bestimmungen des Ephedrins im Nanogrammbereich wird D₂-Ephedrin mit zwei D-Atomen in der N-Methylgruppe als Standard verwendet. Der Einsatz der deuterierten Verbindung, der nur durch die hohe Selektivität der massenspektrometrischen Detektion möglich ist, garantiert weitgehend gleiches Verhalten des Standards bei Extraktion und Derivatisierung.

C. VI. 1. Bestimmung von Ephedrin aus Wasser

Analysenschema

Ephedrin x HCl in 1 ml Wasser (im Zentrifugenröhrchen)

- + 66 mg KCl
- + 0,65 mg NH_4OH - lösung (25 %)
- + 160 ng D_2 -Ephedrin x HCl in 0,2 ml H_2O

Extraktion mit Diäthyläther (5 ml, 2,5 ml, 2,5 ml)

bei 55° C Einengen und in Eppendorfhütchen überführen

im Wasserstrahlvakuum zur Trockne einengen

- + 0,1 ml Pentan
- + 20 mg Schwefel + 0,05 ml 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NEt_3 /10 ml Pentan)
- + 1,35 mg Methylchlorphosphin in 0,075 ml Pentan (0,1 ml Methylchlorphosphin in 10 ml Pentan)

5 Min. Schütteln

- + 20 mg NaHCO_3
- + 1,2 ml Diäthyläther (ungetrocknet)

2 Min. Schütteln

Zentrifugieren und Dekantieren

Im Wasserstrahlvakuum zur Trockne einengen

In 100 μl Diäthyläther aufnehmen

2 μl injizieren (GC/MS - Bedingungen s. C. III.)

Bestimmung des Extraktionsverlustes

Zur Bestimmung des Extraktionsverlustes wird das Verhältnis Peakhöhe Ephedrin : Peakhöhe D₂-Ephedrin nach der oben angegebenen Methode bei definierten Konzentrationen bestimmt. Anschließend wiederholt man die Bestimmung, gibt jedoch das Ephedrin erst nach alleiniger Extraktion des D₂-Standards zu. Bei Vergleich der Quotienten erhält man eine Wiederfindung von 96 %.

$$\frac{\text{Ephedrin x HCl}}{\text{D}_2\text{-Ephedrin x HCl}} = A = 0,89$$

$$\frac{\text{Ephedrin x HCl}}{\text{D}_2\text{-Ephedrin x HCl}} = B = 0,93 \quad (\text{Ephedrin nicht extrahiert})$$

$$\text{Wiederfindung} = \frac{A}{B} = 96 \%$$

Bestimmung des Variationskoeffizienten Vk

80 ng Ephedrin x HCl

160 ng D₂-Ephedrin x HCl

Ansätze: 5

Vk = 2,7

Durchführung: siehe oben

Bestimmung der Linearität

Standard: 160 ng D₂-Ephedrin x HCl

		$\frac{H_{\text{Ephedrin}}}{H_{\text{D}_2\text{-Ephedrin}}}$
Ephedrin x HCl (ng)	Ephedrin (ng/ x 10 ⁻⁴ µmol)	
160	131,8/7,9	1,66
120	98,9/5,9	1,22

Ephedrin x HCl (ng)	Ephedrin (ng/ x 10 ⁻⁴ μmol)	^H D ₂ -Ephedrin
80	65,9/3,9	0,89
60	49,4/2,97	0,66
40	32,9/1,98	0,46

$$r = 0,9988$$

C. VI. 2. Bestimmung von Ephedrin aus Urin

Analysenschema:

Ephedrin x HCl in 1 ml Urin

mit NH₄OH (25%) auf pH 7 bringen
 + 66 mg KCl
 + 0,65 ml NH₄OH - lösung (25 %)
 + 160 ng D₂-Ephedrin x HCl in 0,2 ml H₂O

Extraktion mit Diäthyläther (5 ml, 2,5 ml, 2,5 ml)
 bei 55° C Einengen und in Eppendorfhütchen überführen
 im Wasserstrahlvakuum zur Trockne einengen

+ 0,1 ml Pentan
 + 20 mg Schwefel
 + 0,05 ml 1 m Triäthylaminlösung
 (1,37 ml NEt₃/10 ml Pentan)
 + 1,35 mg Methylchlorphosphin in
 0,075 ml Pentan (0,1 ml Methylchlorphosphin in 10 ml Pentan)

5 Min. Schütteln

+ 20 mg NaHCO₃
 + 1,2 ml Diäthyläther (ungetrocknet)

2 Min. Schütteln

Zentrifugieren und Dekantieren
 im Wasserstrahlvakuum zur Trockne einengen
 in 100 µl Diäthyläther aufnehmen
 2 µl injizieren (GC/MS-Bedingungen: s. C. III.)

Bestimmung des Extraktionsverlustes

(s. C. VI. 1.)

$$\frac{\text{Ephedrin x HCl}}{\text{D}_2\text{-Ephedrin x HCl}} = A = 0,97$$

$$\frac{\text{Ephedrin x HCl}}{\text{D}_2\text{-Ephedrin x HCl}} = B = 1,00 \text{ (Ephedrin nicht extrahiert)}$$

$$\text{Wiederfindung} = \frac{A}{B} = 97 \%$$

Bestimmung des Variationskoeffizienten Vk

80 ng Ephedrin x HCl

160 ng D₂-Ephedrin x HCl

Ansätze: 5

Vk = 3,5 %

Bestimmung der Linearität

Standard: 160 ng D₂-Ephedrin x HCl

Ephedrin x HCl (ng)	Ephedrin (ng/ x 10 ⁻⁴ µmol)	$\frac{H_{\text{Ephedrin}}}{H_{\text{D}_2\text{-Ephedrin}}}$
160	131,8/7,9	1,69
120	98,9/5,9	1,36
80	65,9/3,9	0,97
60	49,4/2,97	0,75
40	32,9/1,98	0,57
20	16,4/0,99	0,34

$$r = 0,9988$$

C. VI. 3. Bestimmung von Ephedrin aus Serum

Analysenschema:

Ephedrin x HCl in 1 ml Serum

- + 66 mg KCl
- + 0,65 ml NH_4OH -Lösung (25 %)
- + 160 ng D_2 -Ephedrin x HCl in 0,2 ml H_2O

Extraktion mit Diäthyläther (5 ml, 2,5 ml, 2,5 ml):

Es wird jeweils 15 Min. geschüttelt, dann 5 Min.
bei 4000 U zentrifugiert und die organische Phase
abpipettiert, bei 55° C Einengen und in ein Eppen-
dorfhütchen überführen

im Wasserstrahlvakuum zur Trockne einengen

- + 0,1 ml Pentan
- + 20 mg Schwefel
- + 0,05 ml 1 m Triäthylaminlösung (1,37 ml NET_3 /10 ml Pentan)
- + 1,35 mg Methyldichlorphosphin in 0,075 ml Pentan
(0,1 ml Methyldichlorphosphin in 10 ml Pentan)

5 Min. Schütteln

- + 20 mg NaHCO_3
- + 1,2 ml Diäthyläther (ungetrocknet)

2 Min. Schütteln

Zentrifugieren und Dekantieren

Im Wasserstrahlvakuum zur Trockne einengen

in 100 μl Diäthyläther aufnehmen

2 μl injizieren (GC/MS - Bedingungen: s. C. III.)

Bestimmung des Extraktionsverlustes

(s. C. VI. 1.)

$$\frac{\text{Ephedrin}}{\text{D}_2\text{-Ephedrin} \times \text{HCl}} = A = 0,80$$

$$\frac{\text{Ephedrin} \times \text{HCl}}{\text{D}_2\text{-Ephedrin} \times \text{HCl}} = B = 0,87$$

$$\text{Wiederfindung} = \frac{A}{B} = 92 \%$$

Bestimmung des Variationskoeffizienten

80 ng Ephedrin x HCl

160 ng D₂-Ephedrin x HCl

Ansätze: 5

Vk = 4,0 %

Bestimmung der Linearität

Standard: 160 ng D₂-Ephedrin x HCl

Ephedrin x HCl (ng)	Ephedrin (ng/x 10 ⁻⁴ μmol)	$\frac{H_{\text{Ephedrin}}}{H_{\text{D}_2\text{-Ephedrin}}}$
160	131,8/7,9	1,56
120	98,9/5,9	1,26
80	65,9/3,9	0,80
60	49,4/2,97	0,58
40	32,9/1,98	0,40

$$r = 0,9965$$

C. VI. 4. Bestimmung des Ephedrinserumspiegels

Bei einem gesunden, nüchternen, männlichen Probanden (Gewicht 77 kg) wird der Ephedrin Spiegel nach der Einnahme einer 50 mg - Dosis Ephedrinhydrochlorid (1 Tabl. Ephedrin Knoll^R) bestimmt. Dazu werden zu den angegebenen Zeiten jeweils 2 ml Blut abgenommen, zentrifugiert und das Serum nach obigem Analysenschema (s. C. VI. 3.) weiterverarbeitet.

Zeit t	$\frac{H_{\text{Ephedrin}}}{H_{\text{D}_2\text{-Ephedrin}}}$	Ephedrin x HCl (ng)	Ephedrin (ng)
h min.			
1 4	1,30	131	107,9
2 4	1,37	140	115,4
3 18	1,19	118	97,2
4 43	0,97	98	80,7
6 30	0,78	78	64,3
24 45	0,29	25	20,6

Der Quotient Peakhöhe Ephedrin : Peakhöhe D₂-Ephedrin wird aus dem Massenfragmentogramm bestimmt. Damit wird aus Abb.11 (B. III. 3. 4. 4.) als Eichkurve der Wert für das Ephedrinhydrochlorid abgelesen und in die Ephedrinmenge umgerechnet.

D. Zusammenfassung

Neue hochreaktive Derivatisierungsreagenzien und ihre Anwendung in der klinischen Chemie.

Problemstellung

Verbindungen, deren chemische Struktur benachbarte funktionelle Hydroxyl- und/oder Aminogruppen aufweist, werden sowohl in großer Zahl vom Körper selbst sezerniert als auch in Form von Arzneimitteln zugeführt. Zu ersteren gehören u. a. die Katecholamine und ihre Metaboliten, zu letzteren die synthetischen Sympathomimetika und Sympatholytika.

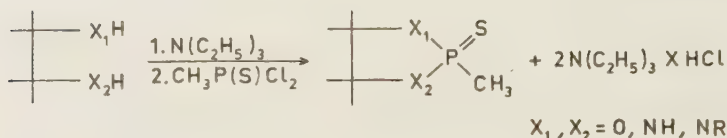
Ziel dieser Arbeit war es, Stoffe dieses Strukturmerkmals durch geeignete Derivatisierungsreagenzien für die gaschromatische Analyse zu erschließen. Wegen der hohen Bildungstendenz der P-O und der P-N - Bindung und der bekannten ausgezeichneten gaschromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften der Dimethylthiophosphinsäurederivate richtete sich unser Augenmerk auf die Synthese und Analyse von Organophosphorderivaten.

Weiterhin sollte anhand der Bestimmung des Plasma- und Urinspiegels eines gängigen Medikamentes eine mögliche klinische Anwendung des neuen Verfahrens untersucht werden.

Ergebnisse

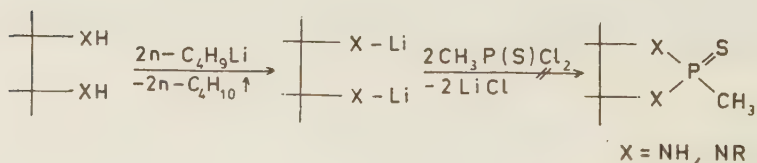
Die Reaktionen verschiedener phosphorhaltiger Reagenzien mit Verbindungen, deren chemische Struktur benachbarte funktionelle Hydroxyl- und/oder Aminogruppen aufweist, wurden untersucht und die Derivate auf ihre gaschromatographischen Eigenschaften überprüft.

Die Umsetzung mit Methylthiophosphonsäuredichlorid und Triäthylamin als Hilfsbase zeigte keine Vorteile zu der aus der Literatur bekannten Umsetzung mit der Äthylverbindung.



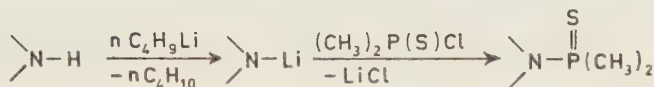
Die Derivatisierungen mußten wegen der niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit mit großem Thiophosphonsäurechloridüberschuß und bei erhöhten Temperaturen durchgeführt werden; mit Ephedrin waren auch nach 1 Stunde noch Spuren der Ausgangsverbindung nachweisbar, außerdem traten zahlreiche Nebenprodukte auf.

Die Umsetzung von Diaminen mit n-Butyllithium und Methylthiophosphonsäuredichlorid nach



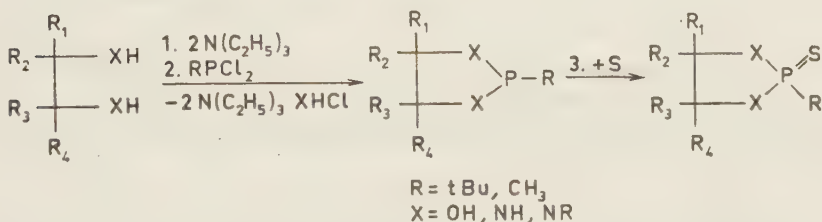
führte zu keinen einheitlichen Reaktionsprodukten.

Dagegen konnte man aus monofunktionellen sekundären Aminen und Dimethylthiophosphinsäurechlorid nach

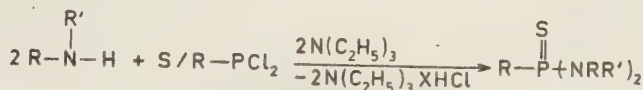


die erwarteten Endprodukte erhalten.

Durch Umsetzungen mit Alkyldichlorphosphinen und elementarem Schwefel machte man sich einerseits die hohe Reaktivität dreibindiger Alkylphosphorhalogenide, andererseits die gute Chromatographierbarkeit von Thiophosphonsäureestern bzw. -amiden für ein Bestimmungsverfahren zunutze.



Durch die 1 : 2 - Umsetzung konnten auch primäre und sekundäre Monoamine derivatisiert werden.



In der Praxis wurde die Reaktion im "Eintopfverfahren" durchgeführt; die zu bestimmende Substanz wird mit dem elementaren

Schwefel und der Hilfsbase in Pentan vorgelegt und anschließend mit dem Alkyldichlorphosphin versetzt.

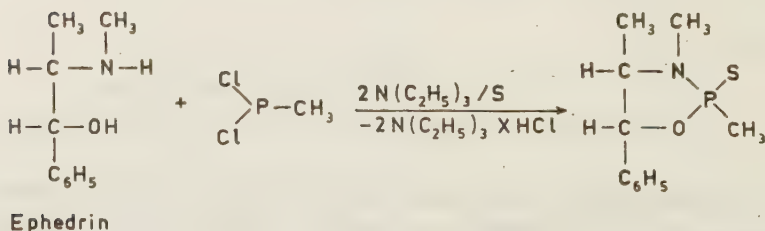
Der Reaktionsmechanismus über den P(III) - Fünfring wurde durch chemische Reaktionen und NMR - spektroskopische Untersuchung bewiesen.

Zahlreiche organische Verbindungen, darunter die Arzneistoffe Ephedrin, Pseudoephedrin, Norephedrin und der β -Blocker Propranolol wurden nach dem neuen Verfahren derivatisiert und die Reaktionsprodukte, die charakteristische Massenspektren mit intensiven Molpeaks aufweisen, mittels GC/MS-Kopplung qualitativ bestimmt.

Vor allen Dingen Methyldichlorphosphin zeichnet sich durch hohe Reaktivität aus, so daß die Umsetzungen bei Raumtemperatur in kürzester Zeit quantitativ ablaufen. Das Reagenz kann trotzdem problemlos in Pentanlösung gehandhabt werden und ist im geschlossenen Gefäß mehrere Tage lagerfähig.

Um die Leistungsfähigkeit des neuen Verfahrens im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendbarkeit zu überprüfen, wurde die quantitative Bestimmung von Ephedrin aus biologischem Material ausgearbeitet.

Aus den wässrigen Lösungen wurde das Ephedrin nach Zugabe von deuteriertem D_2 -Ephedrin als Standard mit Äther extrahiert, umgesetzt und mittels GC/MS-Kopplung detektiert.



Werte für Reproduzierbarkeit (Vk) und Linearität (r)

	Vk	r	Konzentrationsbereich (ng Ephedrin)
Wasser	2,7	0,9988	30 - 130
Urin	3,5	0,9988	15 - 130
Serum	4,0	0,9965	30 - 130

Die Werte für die Reproduzierbarkeit und Linearität genügen hohen Ansprüchen. Die Empfindlichkeit des Verfahrens wurde bei der Bestimmung kleiner Ephedrinmengen deutlich. Die Signalintensität bei der Detektion von 4 ng Ephedrin aus 1 ml Serum läßt noch einen genauen quantitativen Nachweis im Picogrammbereich pro ml Serum erwarten.

Der Ephedrinspiegel eines Probanden nach Einnahme einer Tablette Ephedrin/Knoll^R (50 ng Ephedrinhydrochlorid) wurde in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Der Verlauf der Eliminationskurve sowie die pharmakologischen Parameter gleichen weitgehend den Ergebnissen von Pickup et al.¹⁰⁵⁾ und Midha et al.⁹⁰⁾

Aufgrund der Einfachheit und Schnelligkeit der praktischen Reaktionsdurchführung sollte die Derivatisierung mit Methylchlorphosphin/Schwefel für eine Reihe weiterer biochemischer und pharmakologischer Substanzen mit dem Strukturmerkmal benachbarter Hydroxyl- und/oder Aminogruppen analytische Anwendung finden.

- 1) Änggard E., Fedvall G.,
Anal. Chem. 41, 1250 (1969)
- 2) Asbjørg S., Christoffersen S., Rasmussen K. E.,
J. Chromatogr. 174 (2), 454 (1979)
- 3) Auer M., Dadisch G. L., Kolb B., Machata G.,
Pospisil P., Vycudlik W.,
Angew. Chromatogr. 30, 12 (1977)
- 4) Barry T. L., Petzinger G.,
Biomed. Mass Spectrom. 4 (3), 129 (1977)
- 5) Beckett A. H., Wilkinson G. R.,
J. Pharm. Pharmac. 17, Suppl. 104S
- 6) Beckett A. H., Wilkinson G. R.,
J. Pharm. Pharmac. 17, Suppl. 107S
- 7) Blau K., King G. S.,
Handboock of Derivatives for Chromtoraphy,
Verlag Heyden & Son, London (1978)
2. Auflage
- 8) Blau K., King G. S.,
in Lit. 3), dort S. 104 ff.
- 9) Bowman M. C., Beroza M.,
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 50, 926 (1967)
- 10) Brochmann-Hansen E., T. O. Oke,
J. Pharm. Sci. 58, 370 (1969)
- 11) Brooks C. J. W., Edmonds C. G., Gaskell S. J., Smith A. G.,
Chem. and Phys. of Lipids 21, 403 (1978)
- 12) Brooks C. J. W., Harvey D. J.,
J. Chromatogr. 54, 193 (1971)
- 13) Brown P., Djerassi C.,
Tetrahedron 24, 2949 (1968)
- 14) Brugaard G., Rasmussen K. E.,
J. Chromatogr. 147, 476 (1978)
- 15) Bye C., Hill H. M., Hughes D. T.D., Peck A. W.,
Eur. J. Clin. Pharmacol. 8, 47 (1975)
- 16) Campbell D. B.,
J. Pharm. Pharmac. 21, 129 (1969)
- 17) Carmann H.,
Med. Labor, 30 (9), 231 (1977)
- 18) Chambaz E. M., Horning E. C.,
Anal. Biochem. 30, 7 (1969)

- 19) Cohen I. C., Norcup J., Ruzicka J. H. A., Wheals B. B.,
Chromatogr. 44, 251 (1969)
- 20) Cohen I. C., Norcup J., Ruzicka J. H. A., Wheals B. B.,
J. Chromatogr. 44, 251 (1969)
- 21) Cooper D. B., Harrison J. M., Inch T. D.,
Tetrahedron Lett. 1974, 2697
- 22) Cooper D. B., Hall C. R., Inch T. C.,
J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1975, 721
- 23) Cooper D. B., Hall C. R., Harrison J. M., Inch T. D.,
J. Chem. Soc. (Perkin) 1977, 1969
- 24) Coutts R. T., Dawe R., Jones G. R., Liu S.-F., Midha K. K.
J. Chromatogr. 190, 53 (1980)
- 25) Cummings L. M., Fourier M. J.,
Anal. Lett. 2, 403 (1969)
- 26) Darbré A.,
in Lit. 3), dort S. 264 f.
- 27) Darbré A.,
in Lit. 3), dort S. 269
- 28) Darbré A.,
in Lit. 3), dort S. 270
- 29) Day E. W., Golab T., Koons J. R.,
Anal. Chem. 38, 1053 (1966)
- 30) Deo P. G., Howard P. H.,
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 61, 210 (1978)
- 31) Donike M.,
J. Chromatogr. 78, 273 (1973)
- 32) Dove R. A.,
Anal. Chem. 39, 1188 (1967)
- 33) Drodz J.,
J. Chromatogr. 113, 303 (1975)
- 34) Düsçi L. J., Hackett L. P.,
Clinical Toxicology 14 (5), 587 (1979)
- 35) Edwards D. J., Blau K.,
Anal. Biochem. 45, 387 (1972)
- 36) Fales H. M., Jaouni T. M., Babashek J. F.,
Anal. Chem. 45, 2302 (1973)
- 37) Felcht U.-H.,
EP-OS 0006220 (1979), Hoechst AG

- 38) Fell V., Lee C. R.,
J. Chromatogr. 121, 41 (1976)
- 39) Findlay J. K., Siekmann L., Breuer H.,
Biochem. J. 137, 263 (1974)
- 40) Fischer E.,
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 28, 1167 (1895)
- 41) Forth W., Henschler D., Rummel W.,
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
B.I.-Wissenschaftsverlag, 1975
- 42) Gan I., Korth J., Halpern B.,
J. Chromatogr. 92, 435 (1974)
- 43) Gasco L., Barrera R.,
Anal. Chem. Acata 61, 253 (1972)
- 44) Gaskell S. J., Brooks C. J. W.,
J. Chromatogr. 122, 415 (1976)
- 45) Gaskell S.J., Edmonds C. G., Brooks C. J. W.,
Anal. Lett. 9, 325 (1976)
- 46) Gaskell S. J., Edmonds C. G., Brooks C.J. W.,
J. Chromatogr. 126, 591 (1976)
- 47) Gladstein B. M., Chitov L. N.,
Zh. Obshch. Khim. 39, 1951 (1969)
- 48) Grahl-Nielsen O., Solheim E.,
J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1972, 1092
- 49) Grahl-Nieslen O., Movik B.,
Biochem. Med. 12, 143 (1975)
- 50) Greenhalgh R., Wood P. J.,
J. Chromatogr. 82, 410 (1973)
- 51) Gupta R. C., Lundberg G. C.,
Clinical Toxicology 11 (4), 437 (1977)
- 52) Hall C. R., Williams N. E.,
J. Chem. Soc. (Perkin) 1981, 2746
- 53) Heberer G., Köle W. u. Tscherne H.,
Chirurgie, Lehrbuch für Studierende und Ärzte
Springer Verlag, Heidelberg, 1977,
dort S. 40
- 54) Heenan M. P., McCallum N. K.,
J. Chromatogr. Sci. 12, 89(1974)
- 55) Höfle G., Steglich W., Vorbrüggen H.,
Angew. Chem. 90, 602 (1978)

- 56) Horning M. G., Moss A.M., Boucher E. A., Horning E. C.,
Anal. Lett. 1, 311 (1968)
- 57) Houben-Weyl,
Methoden der organischen Chemie, Bd. XII/1,
Georg Thime Verlag, Stuttgart, 1964
- 58) Hough L., Priddle J. E., Theoblad R. S.,
Adv. Carbohydr. Chem. 15, 91 (1960)
- 59) Huffman M. N., Lott M. H.,
J. Biol. Chem. 215, 627 (1955)
- 60) Jacob K. und Vogt W.,
Forschungsberichte Nr. 2 und Nr. 4,
Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern
(1976, 1979)
- 61) Jacob K., Vogt W., Fischer I., Knedel M.,
Tetrahedron Lett. 1975, 1927
- 62) Jacob K., Vogt W., Knedel M.,
Liebigs Ann. Chem. 1979, 878
- 63) Jacob K., Vogt W.,
J. Chromatogr. 150, 339 (1978)
- 64) Jacob K., Maier E., Schwertfeger G., Knedel M.,
Intern. Sympos. "Mass Spectrometry an Combined Techniques
in Medicine, Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry",
14./15. 11.1977, Tübingen
- 65) Jacob K., Falkner C., Vogt W.,
J. Chromatogr. 162, 67 (1978)
- 66) Jacob K., Vogt W.,
13th Internat. Sympos. "Advances in Chromatography",
16./19. 10.1978, St. Louis, USA
- 67) Jacob K.,
Fortschr. Med. 97, 1279 (1979)
- 68) Jacob K., Krauss C., Schwertfeger G.,
Chromatographia 16, 188 (1982)
- 69) Jacob K., Vogt W., Knedel M., Schäfer W.,
Biomed. Mass Spectrom. 3, 64 (1976)
- 70) Jain N. C., Sneath T. C., Budd R. D., Olson B. A.,
J. of Analytical Toxicology 4 (5), 233 (1977)
- 71) Joint Committee of the Pharmaceutical Society and the
Society for Analytical Chemistry on Recommended Methods
for the Evaluation of Drugs
Analyst-London 100, 136 (1975)

- 72) Kamei K., Murata M., Ishii K., Namekata M., Momose A.,
Chem. Pharm. Bull. 21, 1996 (1973)
- 73) Kawahara K. F.,
Anal. Chem. 40, 1009 (1968)
- 74) Kelly R. W.,
Tetrahedron Lett. 967 (1969)
- 75) Kelly R. W.,
J. Chromatogr. 43, 229 (1969)
- 76) Kelly R. W.,
Steroids 13, 507 (1969)
- 77) Kelly R. W.,
Anal. Chem. 45, 2079 (1973)
- 78) Kelly R. W., Taylor P. L.,
Anal. Chem. 48, 465 (1976)
- 79) Knaus E. E., Coutis R. T., Kazakoff C. W.,
J. Chromatogr. Sci. 14, 525 (1976)
- 80) Kováč P., Anderle D.,
in Lit. 3), dort S. 201
- 81) Kuntzman R. G., Tsai I., Brand L., Mark L. C.,
Clin. Pharmacol. Ther. 12, 62 (1971)
- 82) Kurschakowa n. A., Razumova N. A.,
Zh. Obshch. Khim. 46, 1027 (1976)
- 83) Lai C. M., Stoll R. G., Look Z. M., Yacobi A.,
J. Pharm. Sci. 68, 1243 (1979)
- 84) Landowne R. A., Lipsky S. R.,
Nature 199, 141 (1963)
- 85) Lo L. Y., Land G., Bye A.,
J. Chromatogr. 222, 297 (1981)
- 86) McCallum N. K., Armstrong R. J.,
J. Chromatogr. 78, 303 (1973)
- 87) MacGee J., Allen K. G.,
J. Chromatogr. 100, 35 (1974)
- 88) Mason P. S., Smith E. D.,
J. Gas Chromatogr. 4, 398 (1966)
- 89) Mastronardi I. O., Flematti S. M., Deferrari J. O.,
Gros E. G.,
Carbohydr. Res. 3, 177 (1966)
- 90) Midha K. K., Cooper J. K., McGilveray I. J.,
J. Pharm. Sci. 68 (5), 557 (1979)

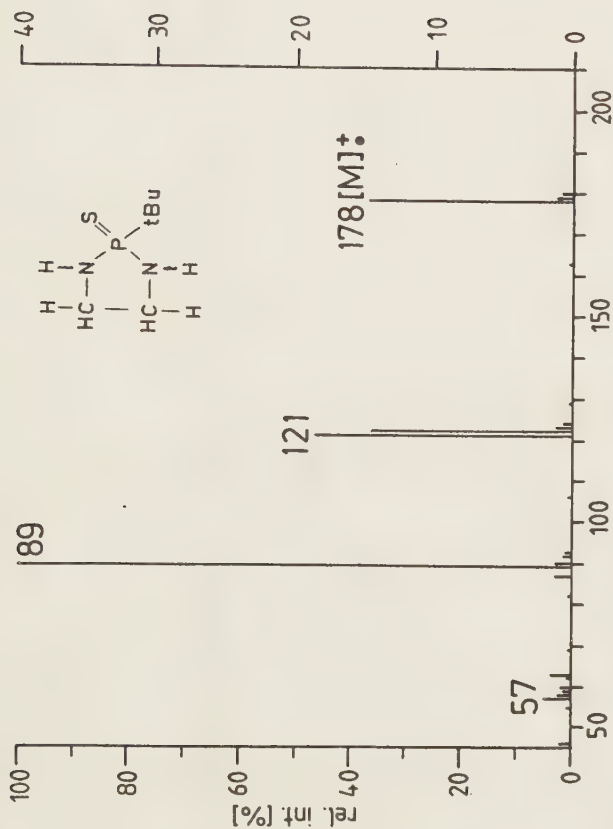
- 91) Miles J. A., Balthazor T. M., Nufer H. L., Beeny M. T.,
Org. Prep. Proceed. Int. 11, 11 (1976)
- 92) Moffat A. C., Horning E. C., Mathin S. B., Rowland M.,
J. Chromatogr. 66, 255 (1972)
- 93) Momose A.,
Japan Electron Optics Laboratory News-Tokyo 15 A (1)
9 (1979)
- 94) Nemirowsky J.,
J. Prakt. Chem. 28, 439 (1883)
- 95) Nicholson J. D.,
The Analyst 103, 1 (1978)
- 96) Nicholson J. D.,
The Analyst 103, 193 (1978)
- 97) Niwaguchi T.,
Koenshu-Iyo Masu Kenkyakai 4, 95 (1979)
- 98) Pace-Asciak C., Wolfe L. S.,
J. Chromatogr. 56, 129 (1971)
- 99) Pace-Asciak C.,
I. Am. Chem. Soc. 98, 2348 (1976)
- 100) Parsons J. S.,
J. Chromatogr. Sci. 11, 659 (1973)
- 101) Perlin A. S.,
Can. J. Chem. 42, 1365 (1964)
- 102) Perry B. J. et al.,
Can. J. Chem. 41, 2299 (1963)
- 103) Perry B. J. et al.,
Can. J. Chem. 38, 1416 (1960)
- 104) Peterson R. L., Rodgerston D. O.,
Clin. Chem. 20, 820 (1974)
- 105) Pickup M. E., Paterson J. W.,
Communications, J. Pharm. Pharmac. 26, 561 (1974)
- 106) Pierce A. E.,
Silylation of Organic Compounds,
Rockford, Illinois (1968)
- 107) Pierce W. O., Lamoreaux T. C., Urry F. M.,
J. of Analytical Toxicology 2 (1), 26 (1978)
- 108) Poole C. F.,
in Lit. 3), dort S. 152
- 109) Poole, C. F.,
in Lit. 3), dort S. 168

- 110) Poole C. F., Singhawangcha S., Zlatkis A.,
Chromatographia, 11, 347 (1978)
- 111) Poole C. F., Singhawangcha S., Zlatkis A.,
J. Chromatogr. 158, 33 (1978)
- 112) Poole C. F., Singhawangcha S., Zlatkis A.,
Analyst (London) 104, 82 (1979)
- 113) Poole C. F., Singhawangcha S., Chen Hu L.E., Zlatkis A.,
J. Chromatogr. 178, 495 (1979)
- 114) Sanger F.,
Biochem. J. 39, 507 (1945)
- 115) Scherer O. J., Klusmann P.,
Z. anorg. allg. Chem. 370, 171 (1969)
- 116) Scherer O. J., Schnabl G.,
Chem. Ber. 109, 2996 (1976)
- 117) Scherer O. J., Schnabl G.,
Inorganica Chimica Acta 19, L 38 (1976)
- 118) Scherer O. J., Schnabl G.,
Angew. Chem. 88, 845 (1976)
- 119) Scherer O. J., Schnabl G.,
Angew. Chem. 89, 500 (1977)
- 120) Scherer O. J.,
Angew. Chem. 81, 871 (1969)
- 121) Scherer O. J., Klusmann P.,
Z. anorg. allg. Chem. 370, 171 (1969)
- 122) Schmutzler R. et al.
J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1974, 2153
- 123) Schrader G.,
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester,
Verlag Chemie, Weinheim, 1963
- 124) Schulz P., Vilceanu R.,
J. Chromatogr. 111, 105 (1975)
- 125) Singhawagcha S., Poole C. F., Zlatkis A.,
J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 2, 77 (1979)
- 126) Stacey Ee. E., Tierney B.,
Carbohydr. Res. 49, 129 (1976)
- 127) Sun S.-R., Leveque M. J.,
J. Pharm. Sci. 68 (12), 1567 (1979)

- 128) Touchstone J. C., Breckwoldt M., Murawec T.,
J. Chromatogr. 59, 121 (1971)
- 129) Vilceanu R., Schulz P.,
J. Chromatogr. 82, 279 (1973)
- 130) Vogt W., Jacob K., Knedel M.,
J. Chromatogr. Sci. 12, 658 (1974)
- 131) Vogt W.,
Habilitationsschrift, Universität München,
Fachbereich Medizin, 1976
- 132) Vogt W., Jacob K., Maier E., Ohnesorge A., Knedel M.,
10. Internat. Kongreß für Klinische Chemie,
26.2./3.3. 1978, Mexico City, Mexico
- 133) Vogt W., Jacob K., Fischer I., Knedel M.,
Z. Anal. Chem. 279, 158, (1976)
- 134) Vogt W., Fischer I., Knedel M.,
Z. Anal. Chem. 267, 28 (1973)
- 135) Vogt W., Jacob K., Fischer I., Knedel M.,
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 12, 45 (1974)
- 136) Walle T.,
Acta Pharm. Suec. 5, 367 (1968)
- 137) Walle T., Ehrsson H.,
Acta Pharm. Suec. 7, 389 (1970)
- 138) Wander J. D., Horton D.,
Adv. Carbohydr. Chem. 32, 15 (1976)
- 139) Warren J. T., Welch R.M., Findlay J. W. A.,
Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Expl. Biol. 725 (1978)
- 140) Weissermel K., Kleiner H.-J., Finke M., Felcht U.-H.,
Angew. Chem. 93, 256 (1981)
- 141) Welling P. G., Lee K. P., Patel J. A., Walker J. E.,
Wagner J. G.,
J. Pharm. Sci. 60, 1629 (1971)
- 142) Weston R., Wheals B. B.,
The Analyst 95, 680 (1970)
- 143) Weygand F., Glockler U.,
Chem. Ber. 89, 653 (1956)
- 144) Weygand F., Steglich W., Tanner H.,
Liebigs Ann. Chem. 658, 128 (1962)
- 145) Weygand F.,
Z. Anal. Chem. 205, 406 (1964)

- 146) Wieber R., Schmidt M.,
Chem. Ber. 96, 1561 (1963)
- 147) Wilkinson G. R.,
Anal. Lett. 3, 289 (1970)
- 148) s. Lit. 2, 4-6, 14-17, 24, 25, 34, 51, 70-72,
81, 83, 85, 90, 93, 97, 105, 107, 127,
139, 141
- 149) s. Lit. 17, 70, 81, 139
- 150) s. Lit. 5, 6, 16, 25, 34, 51, 71, 105, 141
- 151) s. Lit. 14, 24, 72, 85, 90, 93, 127

Anhang: EI - Massenspektren



ib. 14 EI - Massenspektrum von 1

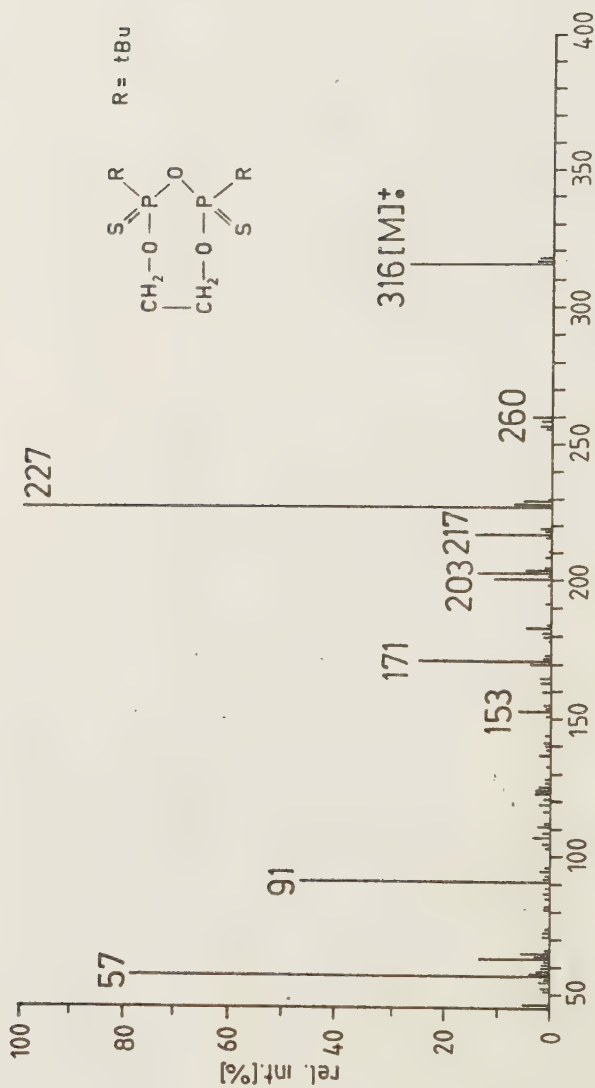


Abb. 15 EI - Massenspektrum des bei der Umsetzung von Äthylenglykol mit t-BuPCl₂ / 5 entstehenden Nebenproduktes

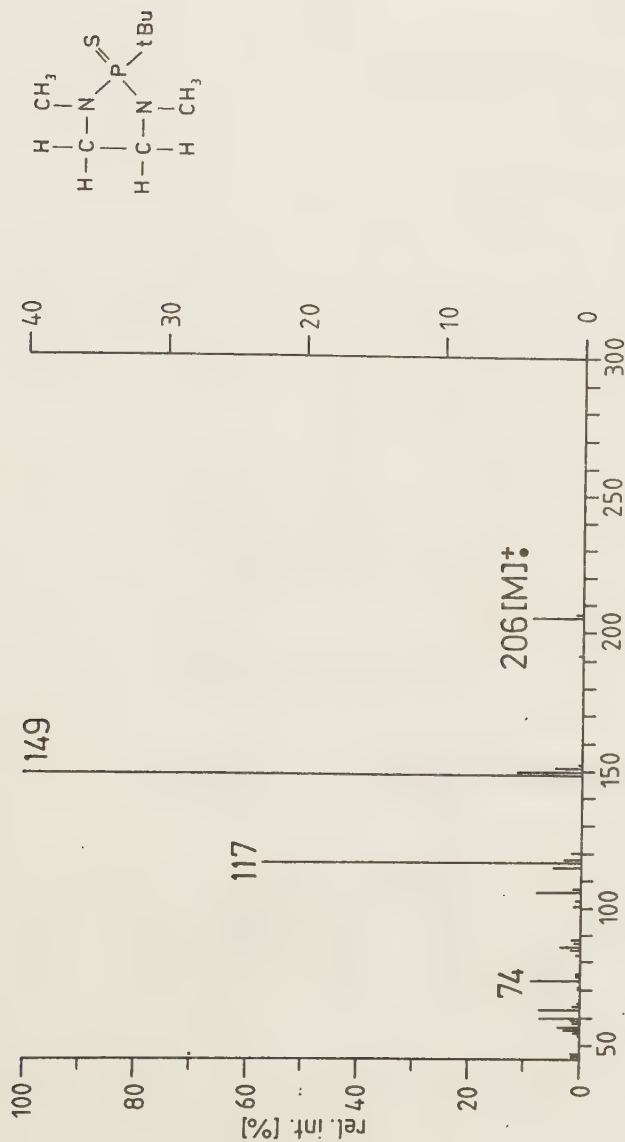


Abb. 16 EI - Massenspektrum von 3

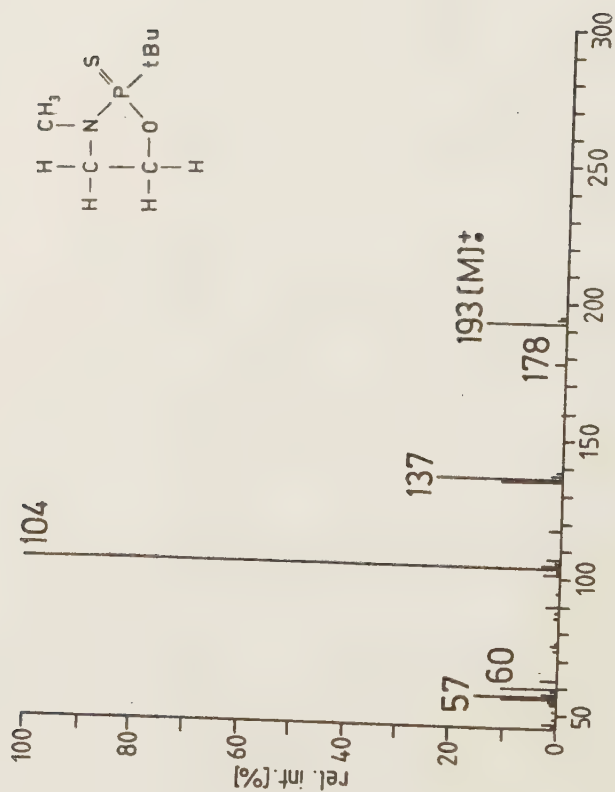


Abb. 17 EI - Massenspektrum von 4

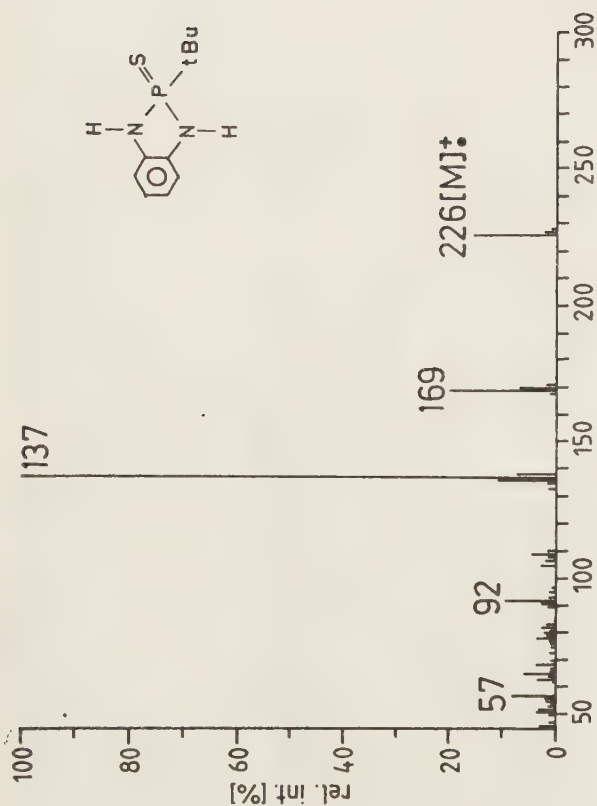


Abb. 18 EI - Massenspektrum von 5

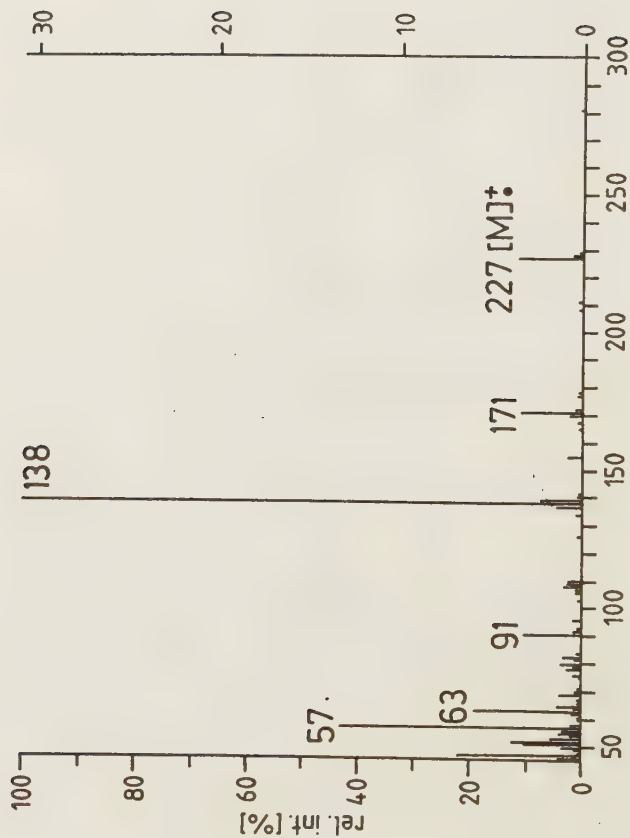
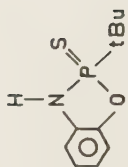


Abb. 19 EI - Massenspektrum von 6

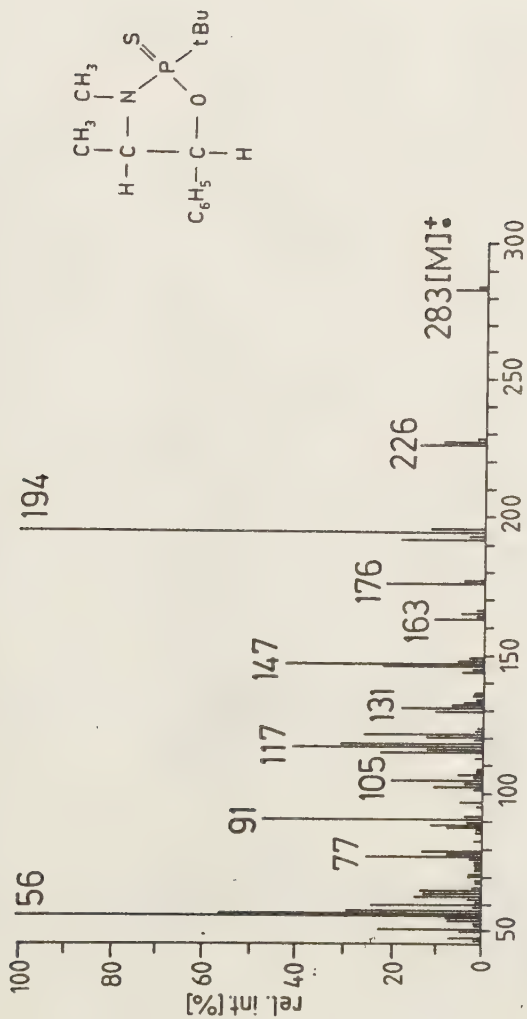


Abb. 20 EI - Massenspektrum von 9 (1. Isomeres)

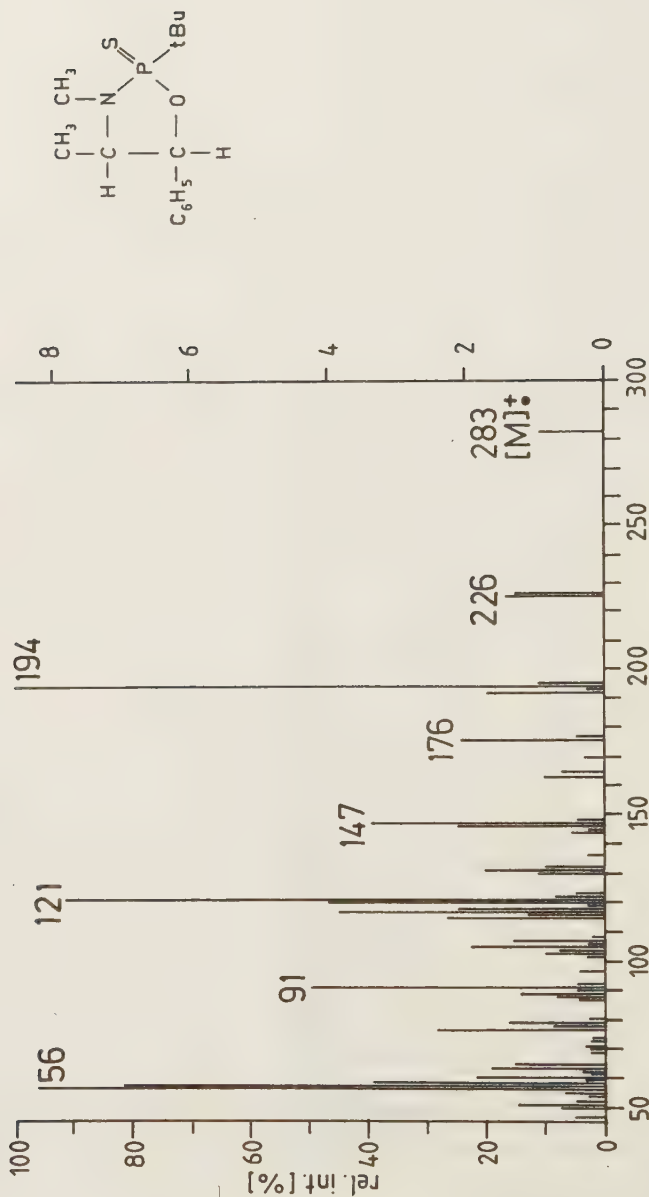


Abb. 21 EI - Massenspektrum von 9 (2-Isomeres)

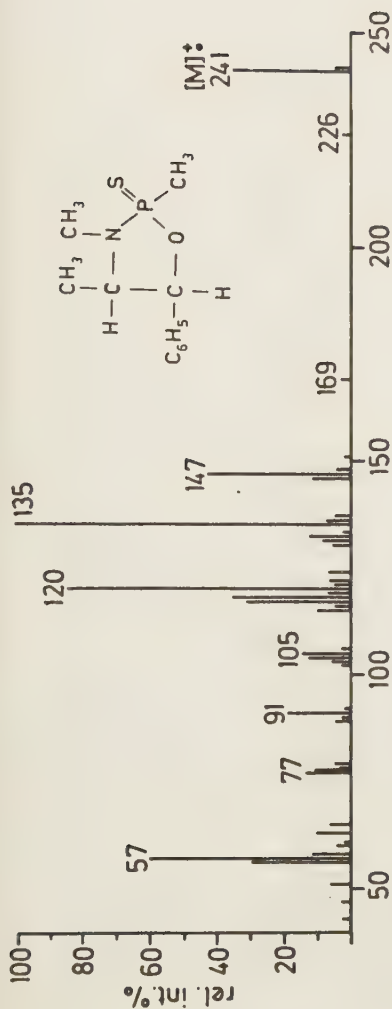


Abb. 22 EI - Massenspektren von 10 (2 Isomere)

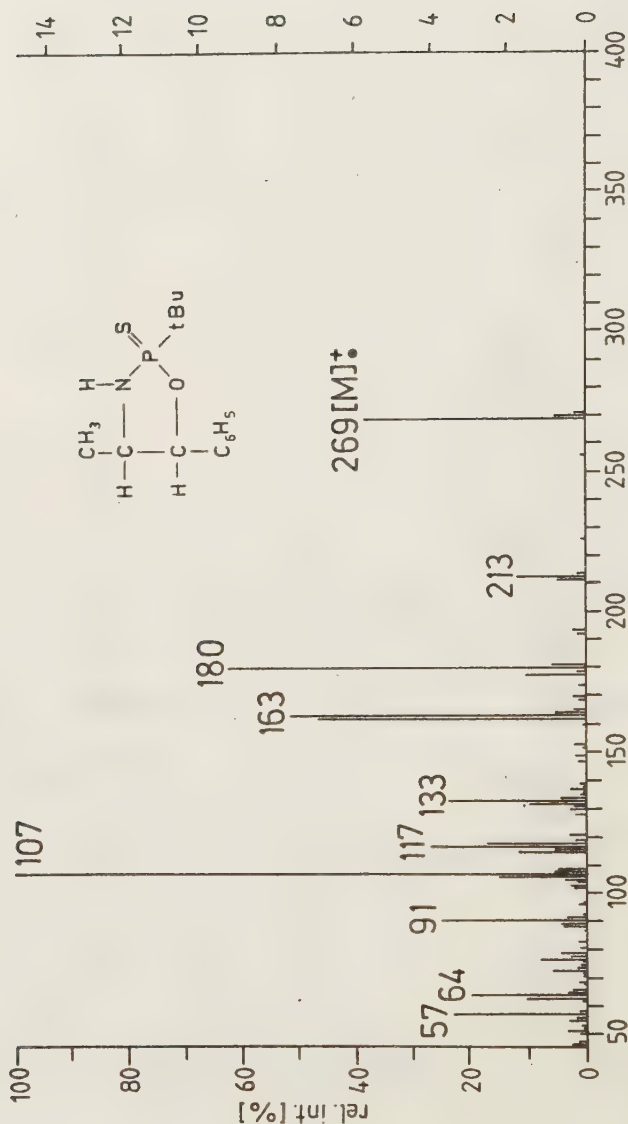


Abb. 23 EI - Massenspektren von 11 (1. Isomeres)

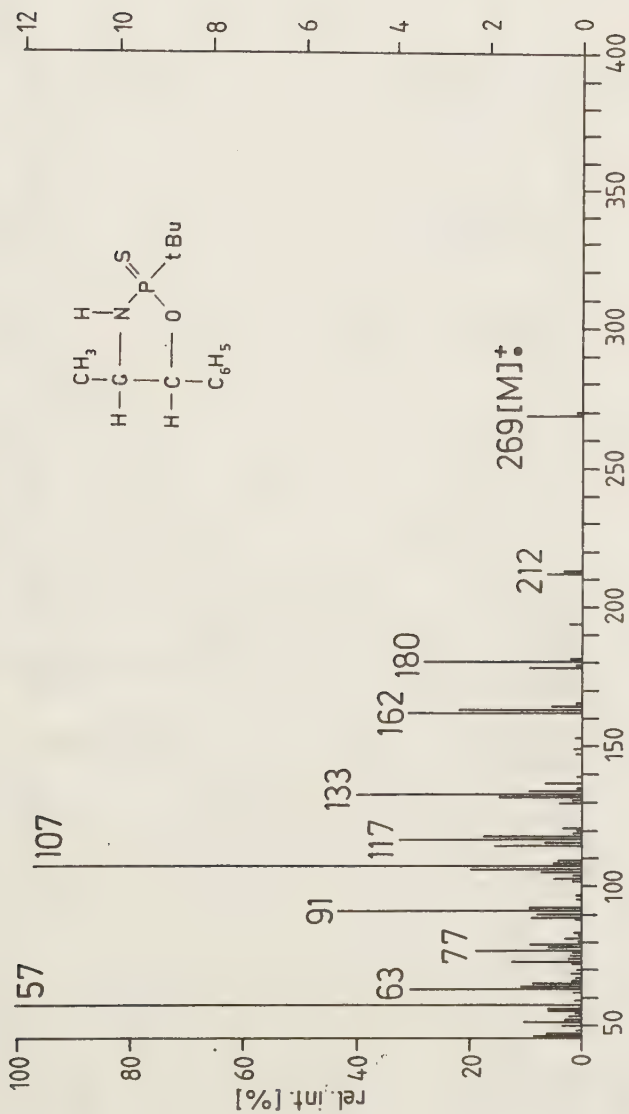


Abb. 24 EI - Massenspektren von 11 (2. Isomeres)

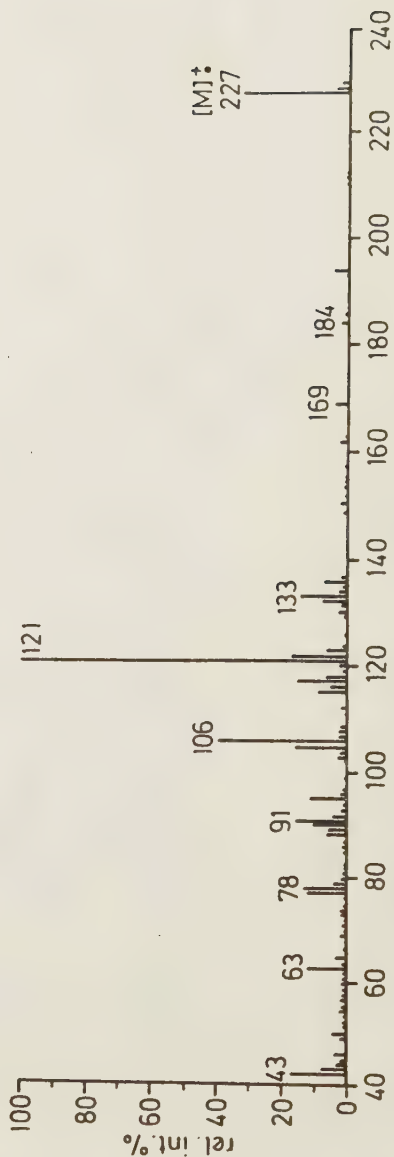
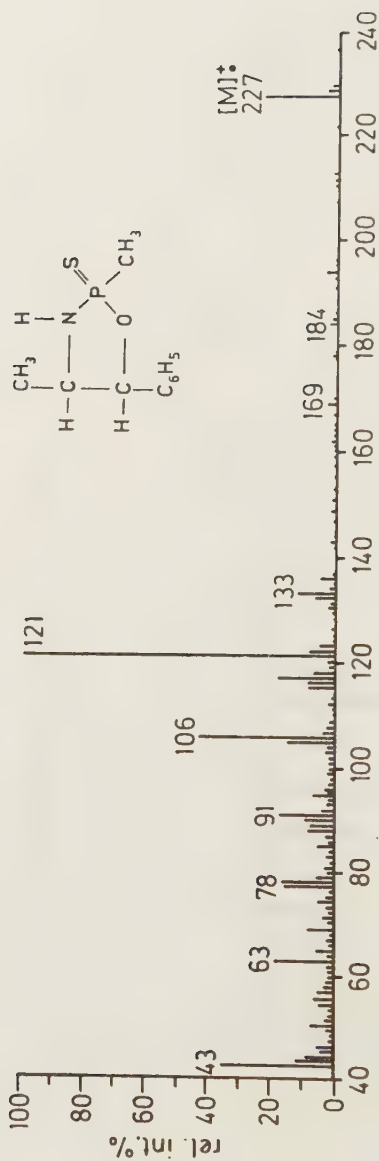


Abb. 25. EI.-Massenspektren von 12 (2 Isomere)

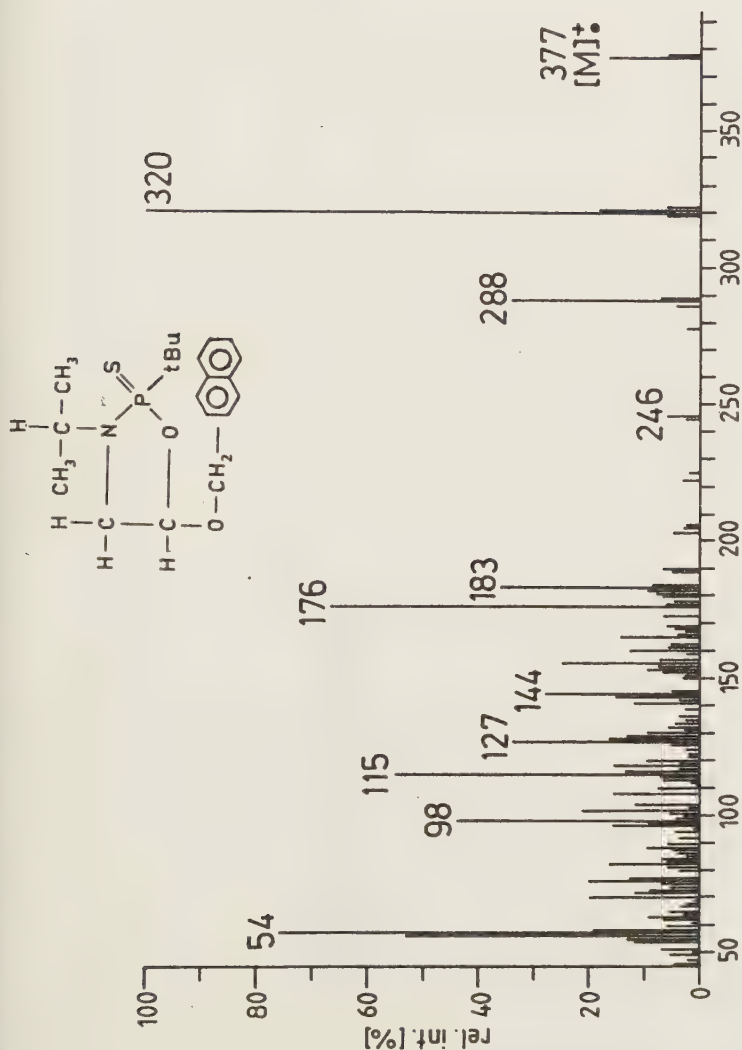


Abb. 26 EI - Massenspektrum von 13 (1. Isomeres)

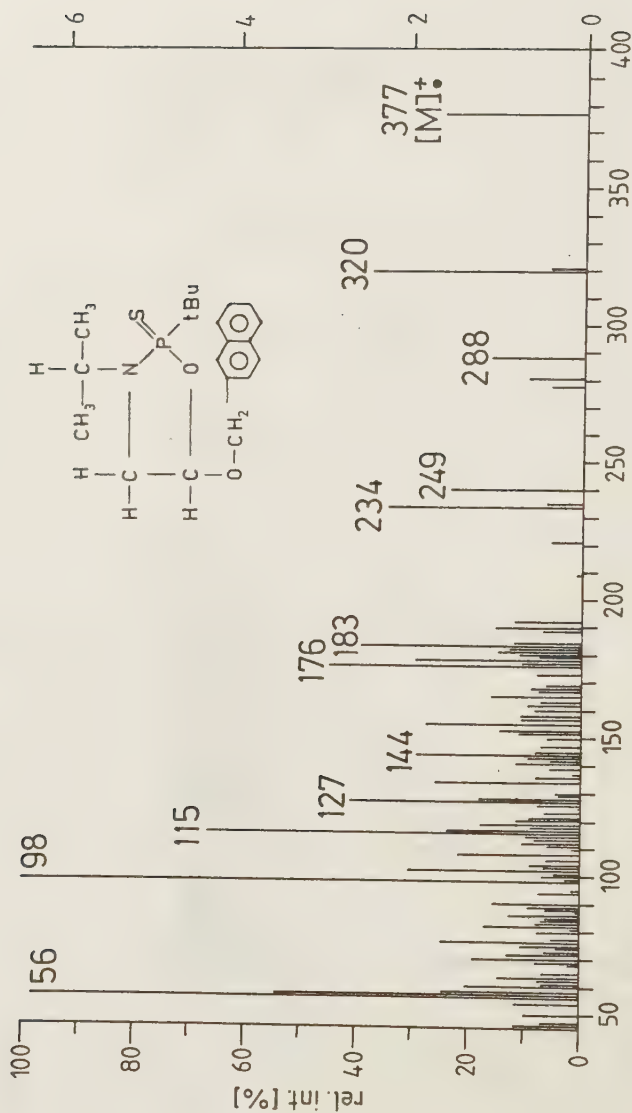


Abb. 27 EI - Massenspektrum von 13 (2. Isomeres)

Lebenslauf

Geburtstag : 14. März 1948
Geburtsort : Amberg/Oberpfalz
Ehefrau : Ilka Schnabl, geb. Krück, Bibliotheksrätin
Eltern : Schnabl Franz, Lehrer
Schnabl Elfriede, geb. Simla, Hausfrau

Schulbesuch : 1954-1958 Volksschule in Auerbach/Opf.
1958-1967 math.-naturw. Gymnasium Pegnitz
1967 Abitur

Chemiestudium : 1967-1972 Universität Würzburg
1972 Diplomhauptprüfung
1972-1977 Doktorarbeit an der Universität
Kaiserslautern unter Herrn Prof.
Dr. O. J. Scherer
1977 Promotion

1973-1977 wissenschaftlicher Assistent im
Fachbereich Chemie der Universität
Kaiserslautern

Medizinstudium: 1975-1979 Universität Heidelberg
1979-1982 Universität München
22. 4. 1982 Medizinisches Staatsexamen
17. 5. 1982 Approbation
1979-1981 Doktorarbeit am Institut für
Klinische Chemie der Universität
München unter der Anleitung
von Herrn Prof. Dr. W. Vogt

seit 1. 6. 1982 Assistenzarzt an der Rehaklinik
: in Wiessee

